

**Funktionelle Charakterisierung des onkogenen Potentials des
p53/p73-Inhibitors deltaTAp73 in
humanen Melanomzelllinien**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock



vorgelegt von

Annett Niemetz, geboren am 20.05.1979 in Schwedt/Oder
aus Berlin

Juni 2009

Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. Brigitte M. Pützer, Universität Rostock

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Martin Hagemann, Universität Rostock

Datum des wissenschaftlichen Kolloquiums: 9.11.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das maligne Melanom: Allgemeines und Epidemiologie.....	1
1.2 Entstehung des Melanoms und Risikofaktoren für die Entstehung	1
1.3 Tumorstadien, Prognose und Therapie des Melanoms	4
1.4 Metastasierung des malignen Melanoms	6
1.5 Das Tumorsuppressorprotein p73	9
1.6 Die onkogenen Isoformen von p73 - Δ TAp73	11
1.7 p73 und Tumorprogression	13
1.8 Arbeitshypothese und Zielstellung	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Zelllinien	17
2.1.2 Plasmide, Adenoviren	17
2.1.3 Antikörper	17
2.1.4 Chemikalien, Puffer und Enzyme	18
2.1.5 Oligonukleotide	18
2.1.6 Kits	20
2.1.7 Geräte.....	20
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 DNA-Arbeitstechniken.....	21
2.2.1.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	21
2.2.1.2 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion	21
2.2.1.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	22
2.2.2 RNA-Arbeitstechniken	23
2.2.2.1 RNA-Extraktion	23
2.2.2.2 Reverse Transkription	23
2.2.3 Protein-Arbeitstechniken.....	24
2.2.3.1 Proteinextraktion.....	24
2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	24
2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.2.3.4 Western-Blot und Immundetektion	26
2.2.4 Zellbiologische Arbeitstechniken	26
2.2.4.1 Zellkultur.....	26
2.2.4.2 Bestimmung der Zellzahl.....	27
2.2.4.3 Stabile Transfektion.....	27
2.2.4.4 Transduktion von Zellen mit adenoviralen Vektoren	27
2.2.4.5 <i>Colony formation</i> Assay.....	28
2.2.4.6 <i>In-vitro</i> -Invasionsassay (<i>Boyden-Chamber</i> -Assay).....	28
<i>In-vitro</i> -Migrations-Assay (<i>Scratch</i> Assay)	30
Anoikis-Assay	30
Zelladhäsionsassay	30
Durchflusszytometrie-Analyse (Quantifizierung apoptotischer Zellen durch Propidium-Iodidfärbung)	31
Immunfluoreszenz	31
Aktinfärbung mit Phalloidin/TRITC	32

Oligonukleotid-Microarray Analyse	32
GeneChip®-Arrays/ GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array.....	32
cRNA-Präparation, Array-Hybridisierung und Datenprozessierung	33
Auswertung der Array-Daten	34
3. Ergebnisse	36
3.1. Exogene Expression von Δ TAp73 in nicht metastasierenden humanen Melanom-Zelllinien	36
3.2. Funktionelle Charakterisierung der Δ TAp73-exprimierenden Zelllinien in vitro	37
3.2.1. Soft-Agar-Assay	37
3.2.2. Boyden-Chamber-Assay	39
3.2.3. Scratch-Assay	42
3.2.4. Anoikis-Assay	44
3.2.5. Adhäsionsassay	47
3.2.6. Induktion von Apoptose durch Chemotherapeutika.....	49
3.3. Einfluss der Überexpression von Δ TAp73 auf die Zellmorphologie und die Organisation des Zytoskeletts	51
3.3.1. Aktinfärbung	51
3.3.2. Immunfärbung von Vimentin und β -Catenin.....	54
3.4. Einfluss der Überexpression von Δ TAp73 auf das Genexpressionsprofil von nicht metastasierenden Melanom-Zelllinien	57
3.4.1. GeneChip®-Array Analyse.....	57
3.4.2. Validierung der GeneChip®-Ergebnisse mittels semiquantitativer RT-PCR und Western Blot.....	65
4 Diskussion	71
4.1 Ausbildung eines invasiveren Phänotyps bei Melanomzelllinien durch Δ TAp73.....	72
4.2 Auswirkungen ektopter Expression von Δ TAp73 auf das Zytoskelett	73
4.3 Auswirkungen ektopter Expression von Δ TAp73 auf die EMT-Markerproteine Vimentin, E-Cadherin und β -Catenin.....	75
4.4 Auswirkungen ektopter Expression von Δ TAp73 auf die Genexpression.....	76
Hochregulierte Gene	77
Proteine der S100-Familie S100A2/S100A4	77
Negativ regulierte Gene	80
E-Cadherin	80
MMP-8	81
4.5 Signalwege, die von Δ TAp73 reguliert werden	82
4.6 Wie regulieren Transaktivierungs-defiziente p73-Isoformen die Expression von Zielgenen und somit die Tumorprogression?.....	85
4.7 Ausblick	87
5 Zusammenfassung	88
6 Literaturverzeichnis.....	89
Danksagung	113
Lebenslauf	114
Publikationen.....	115
Erklärungen	116

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
ADR	Adriamycin
Apaf1	<i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>
AS	Aminosäuren
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Carboxy-terminal
cDDP	Cisplatin
cDNA	mRNA komplementärer Strang (= <i>complementary DNA</i>)
CMV	Cytomegalievirus
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (= <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
et al.	et alii
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>Extracellular matrix</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	<i>enzyme immunosorbent assay</i>
FACS	Durchflusszytometer (= <i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FCS	fetales Kälberserum (= <i>fetal calf serum</i>)
FN	Fibronectin
GFP	Grün-Fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HRP	Meerrettich-Peroxidase (= <i>horseradish peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
kB	Kilobase
kDA	Kilo-Dalton

LMN	Laminin
LK	Lymphknoten
Luc	Luciferase
MOI	Infektionsmultiplizität (= <i>multiplicity of infection</i>)
MCAM	Melanoma Cell Adhesion Molecule
mRNA	<i>messenger</i> RNA
min	Minute
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
N	Amino-terminal
OD	Optische Dichte sowie Oligomerisierungsdomäne
OU	optische Einheit (<i>optical unit</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pfu	Plaue bildende Einheiten (= <i>plaque forming units</i>)
pH	potentia hydrogenii
PI	Protease Inhibitor
PolyHEMA	Poly (2-hydroxyethyl methacrylate)
Puro	Puromycin
RGP	<i>radial growth phase</i>
RNA	Ribonukleinsäure (= <i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (= <i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit reverser Transkription
s	Sekunde
S9	<i>ribosomal protein S9</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
TA	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tet	Tetrazyklin
TGFB	<i>transforming growth factor beta</i>
T_M	Schmelztemperatur
TNF	<i>tumor necrosis factor'</i>
TP	Tumorprotein
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
U	Units (Enzymaktivität; 1U = 1 mol x min ⁻¹)

UV	Ultraviolettes Licht
VGP	<i>vertical growth phase</i>
vs.	versus
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
wt	Wildtyp
XTT	<i>sodium 3'-[1- (phenylaminocarbonyl)- 3,4- tetrazolium]-bis (4-methoxy- 6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate</i>

1 Einleitung

1.1 Das maligne Melanom: Allgemeines und Epidemiologie

Es gibt verschiedene Arten von Tumoren, die unter dem Begriff „Hautkrebs“ zusammengefasst werden; diese sind in erster Linie Basalzellkarzinome (Basaliome), Plattenepithelkarzinome (Spinaliome) und maligne Melanome. Das maligne Melanom, auch schwarzer Hautkrebs genannt, ist der seltenste und zugleich bösartigste Hautkrebs. Diese Tumoren sind bösartige Wucherungen der Melanozyten, der melaninbildenden Zellen der Haut. Die Inzidenz des Melanoms, d.h. die Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr pro 100.000 Einwohner, variiert weltweit sehr stark und ist dramatisch angestiegen, schneller als bei anderen Neoplasmen (11). So werden in Deutschland pro Jahr 12-14 neue Melanome pro 100.000 EW diagnostiziert, in den USA sind es 10-20 und in Australien sogar mehr als 50 (2,11 und www.melanom.net). Die Sterblichkeitsrate des Melanoms stieg allerdings nicht so stark an, was vermutlich an der verbesserten Früherkennung liegt. Das Melanom betrifft im Gegensatz zu den meisten anderen Krebsarten auch junge Menschen. So sind 80 % der Betroffenen in den USA zwischen 20 und 74 Jahre alt (11). Das Melanom-Risiko für Männer ist ca. 1,5 fach höher als das der Frauen, früher galt für Männer ein doppeltes Risiko als für Frauen. Die körperliche Ausbreitung der Primärtumore ist allerdings geschlechtsspezifisch. Bei Frauen treten 40 % aller Melanome an den Beinen und bei Männern am oberen Torso auf (2).

1.2 Entstehung des Melanoms und Risikofaktoren für die Entstehung

Melanome entstehen aus maligne entarteten Melanozyten. In der Embryonalentwicklung entstammen Melanozyten den Melanozyten-Vorläuferzellen, sogenannten Melanoblasten, aus der Neuralleiste, welche im weiteren Verlauf in viele Gewebe, inklusive der Haut, einwandern und zu Melanozyten differenzieren. In der Basalzellschicht der Epidermis (Stratum basale) bilden sie dann dendritische Kontakte mit mehreren Keratinozyten aus, über welche sie das Pigment Melanin in Form von Melanosomen an die Keratinozyten abgeben. Das Melanin wird in den Keratinozyten gespeichert, es absorbiert dort die ultraviolette Strahlung und verhindert die UV-induzierte Bildung freier Radikale durch Umwandlung der

Strahlungsenergie in Wärme (3). Auf diese Weise schützen Melanozyten die Haut vor Schädigungen durch UV-Strahlung. Es gibt zwei chemisch verschiedene Formen des Melanins, das braun-schwarze Eumelanin und das rötlich-gelbliche Phäomelanin, von denen nur Eumelanin nennenswerte photo-protektive Eigenschaften besitzt. Haut- und Haarfarbe eines Menschen wird bestimmt durch das Mischungsverhältnis der beiden Melanintypen.

Paradoxerweise können Melanozyten genau durch das Agens, vor dem sie die Hautzellen schützen sollen, nämlich die UV-Strahlung, transformiert werden und es kann zur Entstehung von malignen Melanomen kommen (1).

Die weltweit höchste Melanom-Inzidenz wurde in Queensland, Australien verzeichnet. Dort wird durchschnittlich bei einem von 19 Männern über 50 Jahren und einer von 25 Frauen im selben Alter ein Melanom diagnostiziert (12). Diese Tatsache und die weltweit ansteigende Inzidenz des Melanoms bestätigen die Annahme, dass sonnenabhängige ultraviolette Strahlung ein bedeutendes Risiko für das Entstehen eines Melanoms darstellt. Tatsächlich geht man heute davon aus, dass UV-Strahlung der wichtigste Risikofaktor für die Melanomentstehung ist (1). Dafür sprechen weiterhin das häufigere Auftreten von Melanomen bei weißen Bevölkerungsgruppen und die niedrigere Inzidenz bei dunkelhäutigen Populationen. Da weißhäutige Personen einen geringeren Anteil an Eumelanin in der Haut aufweisen, ist der Schutz vor UV-Schäden weniger stark ausgeprägt als bei dunkelhäutigen Menschen und es kommt häufiger zur Schädigung und Entartung von Melanozyten. Als Quelle ultravioletter Strahlung gelten natürlich auch die „künstlichen Sonnen“ im Solarium. Auch wenn immer wieder bestritten wird, dass regelmäßige Solariumbesuche Hautkrebs auslösen, zeigen mehrere Fall-Kontroll-Studien, dass eine längere Expositionsdauer und ein jüngeres Lebensalters bei der Erstexposition das Risiko des Solariumkunden, ein Melanom zu entwickeln, deutlich erhöhen (13).

Ein weiteres Risiko für die Entstehung maligner Melanome sind Muttermale, sogenannte Nävi. Diese entstehen, wenn die normalerweise isoliert zwischen den Keratinozyten liegenden Melanozyten proliferieren. Dies kann vor oder nach der Geburt passieren, und man unterscheidet dann kongenitale (angeborene) und erworbene Nävi. 25% der Melanome entstehen aus bereits existierenden Nävi (1). Für das Melanomrisiko ist die Anzahl, Größe und Art des Muttermals ausschlaggebend. Eine besondere Form der Muttermale sind die dysplastischen Nävi. Sie gelten als Vorstufe des Melanoms. Diese unterscheiden sich von normalen „harmlosen“ Muttermalen durch das Vorkommen von atypischen Zellen. Außerdem sind sie durch ungewöhnliches Aussehen gekennzeichnet, was sich in unregelmäßiger Form, Farbe und großer Größe äußert. Es gibt Familien, in denen sich das Auftreten von

dysplastischen Nävi und Melanomen häuft. In solchen Fällen spricht man vom dysplastischen Nävus-Syndrom oder auch Melanom-Syndrom (14). Patienten mit diesem Syndrom haben ein 100-fach erhöhtes Melanomrisiko, 50% dieser Menschen entwickeln bis zum 50. Lebensjahr mindestens ein Melanom (15).

Neben ultravioletter Strahlung und dem Vorkommen von Muttermalen gibt es noch andere Faktoren, die das Melanomrisiko erhöhen. Dazu gehören Immunsuppression des Patienten, phänotypische Charakteristika, wie helle Augenfarbe und Haarfarbe, Sommersprossen, Sonnenempfindlichkeit der Haut und die Familiengeschichte hinsichtlich Melanomen. So haben Patienten mit einem Melanom bei einem Verwandten ersten Grades ein zweifach erhöhtes Risiko, selbst ein Melanom zu entwickeln (1). 10% aller Melanome entstehen in familiär vorbelasteten Patienten (16). In diesen Familien gibt es meist eine genetische Prädisposition, häufig verursacht durch Mutationen des *CDKN2A*-Gens, welches für zwei Tumorsuppressorproteine p16(INK4A) und p14(ARF) kodiert. Seltener finden sich Mutationen im *CDK4*-Gen (17, 18). Diese Proteine sind beteiligt an der Regulation des Zellzyklus. CDK4 (*cyclin dependent kinase 4*) treibt den Zellzyklus an, indem es das Retinoblastomaprotein (RB) phosphoryliert und damit E2F aktiviert (94). P16 bindet an CDK4 und inhibiert deren Funktion, sodass es zum Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase kommt (92). Das Produkt eines alternativen Leserahmens im *CDKN2A*-Gen ist p14(ARF), welches indirekt die Stabilisierung und Akkumulation des Tumorsuppressorproteins p53 in der Zelle bewirkt (93). Mutationen, die die Tumorsuppressorproteine p16 und p14(ARF) inaktivieren, bzw. das Onkogen CDK4 überaktivieren sind häufig mit familiären Melanomen assoziiert.

Abbildung 1.1 zeigt schematisch die Entstehung eines Melanoms aus einem Melanozyten oder Nävus bis hin zum metastasierenden Melanom. Die Melanozyten befinden sich in der Dermis-Epidermis-Grenze der Haut. Durch ein transformierendes Ereignis beginnen sie, sich unkontrolliert zu teilen. Zunächst wachsen sie noch innerhalb der Epidermis und breiten sich in horizontaler Richtung aus. Diese Phase nennt man radiale Wachstumsphase (RGP = *radial growth phase*). Sie kann Jahre bis Jahrzehnte andauern und ist mit einer relativ guten Prognose für den Patienten verbunden, da die Zellen zu diesem Zeitpunkt i.d.R. noch keine metastatischen Eigenschaften aufweisen (5). Die nächste Phase der Melanomprogression beginnt mit dem Durchbruch der Zellen durch die Basalmembran in die Dermis. Das Wachstum erfolgt nun auch in vertikaler Richtung, weshalb man dann von der vertikalen Wachstumsphase (VGP = *vertical growth phase*) spricht. Der Übergang in diese Phase ist assoziiert mit der Aneignung metastasierender Fähigkeiten der Zellen (5). Die 5-Jahres-

Überlebensrate von Patienten mit RGP-Melanom beträgt 100%, mit VGP-Melanom dagegen nur 63,7% (19). Dadurch wird deutlich, wie kritisch dieser Schritt in der Progression des Melanoms ist. Es folgt die weitere Entwicklung der Melanomzellen zu noch höherer Aggressivität, die sich durch umfangreiche Vaskularisierung und Invasivität auszeichnet (4), bis hin zum metastasierenden Melanom.

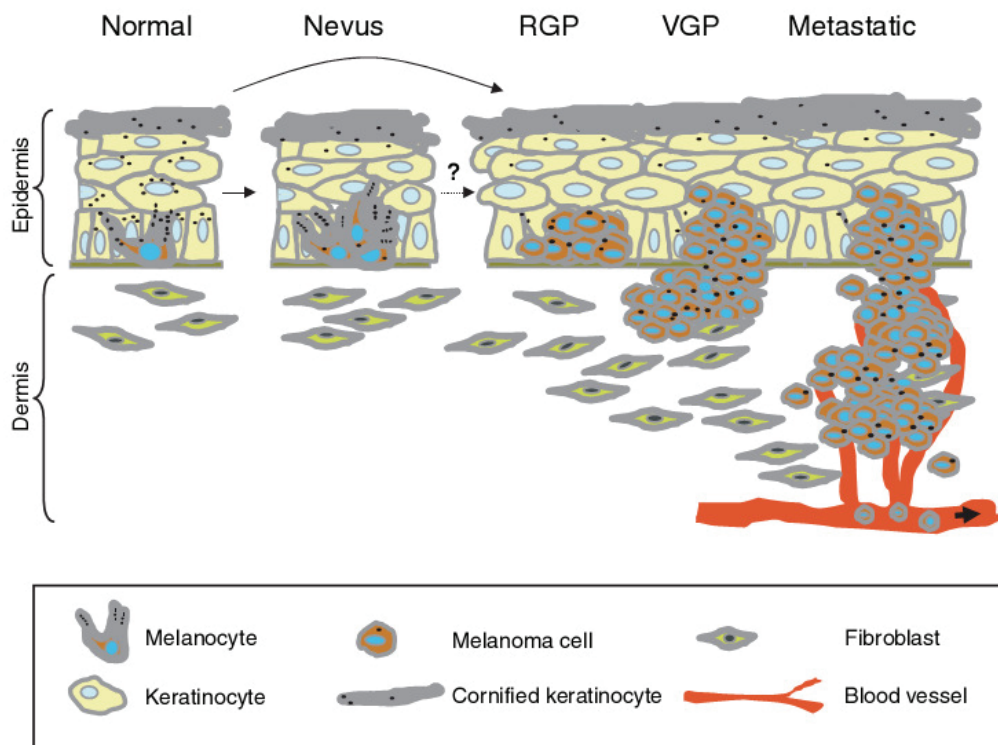


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Entstehung eines Melanoms. Quelle: Gaggioli and Sahai, 2007 (4)

1.3 Tumorstadien, Prognose und Therapie des Melanoms

Pathologisch werden Melanomerkrankungen in 4 Stadien eingeteilt. Stadium I und II beinhalten lokalisierte Melanome ohne Lymphknotenmetastasen, die sich nur in der Tumordicke und dem Auftreten oder Nicht-Auftreten von Wundenbildung (Ulzeration) unterscheiden. Prognostisch bedeutet eine größere Tumordicke und/oder Ulzeration eine geringere Lebenserwartung für den Patienten. In Stadium III sind ein oder mehrere Lymphknoten von Metastasen befallen oder es treten In-Transit-Metastasen oder Satelliten auf. Dabei ist die Anzahl der betroffenen Lymphknoten bedeutend für die Überlebensvorhersage. Das Auftreten von Fernmetastasen, z.B. in der Lunge oder anderen

inneren Organen, bewirkt die Hochstufung des Patienten in Stadium IV. In diesem Stadium beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate nur noch maximal 16% und minimal 3%, was die Aggressivität des metastasierenden Melanoms verdeutlicht. In Tabelle 1.1 sind die pathologischen Stadien des Melanoms zusammengefasst. Es werden auch die 10-Jahres-Überlebensraten für jedes Stadium aufgeführt.

Tabelle 1.1: Pathologische Stadien des Melanoms und Überlebensraten (9, 10). (Tumordicke T1: ≤ 1 mm, T2: 1,01-2 mm, T3: 2,01-4 mm, T4: >4 mm, Lymphknoten N1: 1 befallener LK, N2: 2-3 befallene LK, N3: ≥ 4 befallene LK oder Kombinationen von In-Transit-Metastasen oder Satelliten und befallenen LK)

Pathologisches Stadium	Tumordicke T	Lymphknotenmetastasen N (befallene Lymphknoten)	Fernmetastasen M	10-Jahres-Überlebensrate (%)
0	Tis	N0	M0	100
IA	T1a (keine Ulzeration)	N0	M0	88
IB	T1b (Ulzeration)	N0	M0	83
IIA	T2a (keine Ulzeration)	N0	M0	79
	T2b (Ulzeration)	N0	M0	64
IIB	T3a (keine Ulzeration)	N0	M0	64
	T3b (Ulzeration)	N0	M0	50
IIC	T4a (keine Ulzeration)	N0	M0	54
	T4b (Ulzeration)	N0	M0	32
IIIA	T1-4a	N1a (Mikrometastasen)	M0	63
IIIB	T1-4b	N2a (Mikrometastasen)	M0	57
		N1a (Mikrometastasen)	M0	38
	T1-4a	N2a (Mikrometastasen)	M0	36
		N1b (Makrometastasen)	M0	48
	T1-4a/b	N2b (Makrometastasen)	M0	39
		N2c (In-Transit-Metastasen oder Satelliten)	M0	...
IIIC	T1-4b	N1b (Makrometastasen)	M0	24
		N2b (Makrometastasen)	M0	15
IV	Alle T	N3	M0	18
	Alle T	Alle N	M1a (Metastasen in Haut, Subcutis oder Lymphknoten)	16
			M1b (Lungenmetastasen)	3
			M1c (alle anderen Fernmetastasen)	6

Aus den 10-Jahres-Überlebensraten der einzelnen Melanomstadien geht deutlich hervor, dass mit dem Auftreten von Metastasen in Lymphknoten oder entfernten Organen die Lebenserwartung des Patienten drastisch sinkt. Das ist auf das weitgehende Fehlschlagen sämtlicher gängiger Tumorthapien zurückzuführen. Der Einsatz von Chemotherapeutika wie Dacarbazin, biologisch aktiven Substanzen wie Interleukin 2 und Interferon α , Bestrahlungstherapie und sogar Melanomimpfstoffen führte zu keiner signifikanten

Verlängerung der Lebensdauer von Patienten mit metastasiertem Melanom (6). Die Entwicklung einer alternativen Therapie ist demnach erforderlich, die speziell die molekulare Pathologie des metastasierenden Melanoms adressiert.

1.4 Metastasierung des malignen Melanoms

Das humane maligne Melanom ist ein aggressiv und invasiv wachsender Tumor, der durch frühe Metastasierung und Resistenz gegenüber Apoptose-auslösenden Agenzien wie Chemotherapeutika oder Bestrahlung gekennzeichnet ist. Da die Therapie des Melanoms insbesondere im Stadium der Metastasenbildung bis heute weitgehend erfolglos scheint, ist die Aufklärung der molekularen Prozesse, die zur Ausbildung des metastatischen Phänotyps führen, von zentraler Bedeutung für die Entwicklung neuer, spezifischer Therapieansätze.

Metastasierung ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem sich Tumorzellen aus dem Primärtumor lösen, ins vaskuläre oder lymphatische Gefäßsystem eindringen, dort überleben und wieder aus den Gefäßen ausbrechen. An einer vom Primärtumor entfernten Stelle mit fremder physiologischer Umgebung siedeln sich die Tumorzellen wieder an und bilden einen sekundären Tumor aus. Dieser Prozess ist hoch selektiv (20), da die Tumorzellen einer Reihe von Stresssituationen ausgesetzt werden, die Veränderungen der Genexpression und bestimmter Zelleigenschaften erfordern. Abbildung 1.2 zeigt den klassischen Ablauf der Metastasierung.

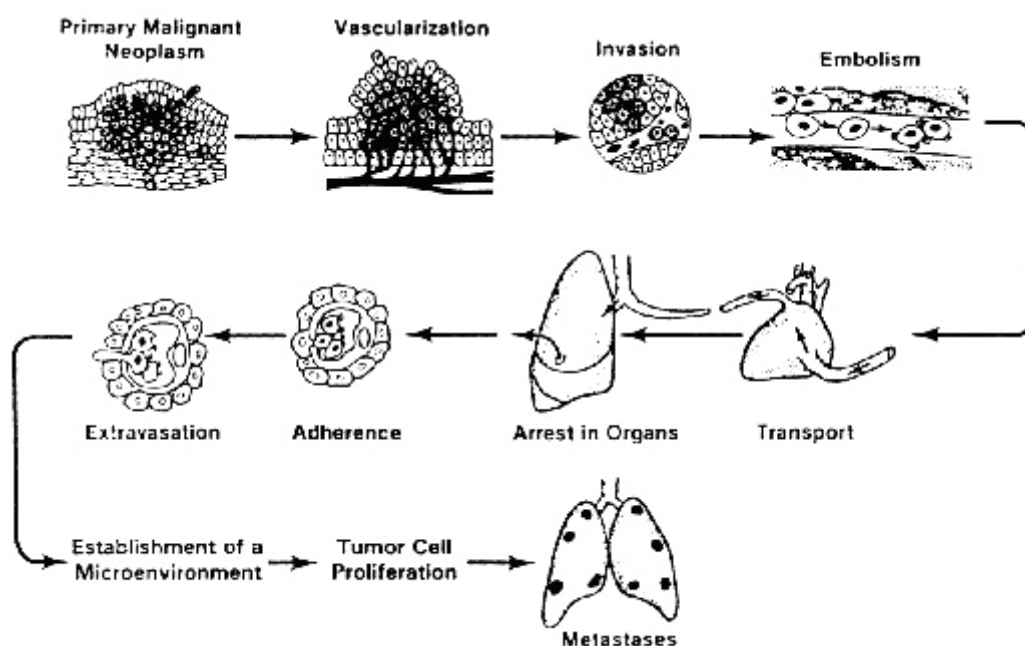


Abb. 1.2: Mechanismus der Metastasierung am Beispiel der hämatogenen Metastasierung in die Lunge (nach Fidler, 20).

Zunächst existiert ein primärer Tumor, der progressiv wächst. Wenn Tumoren einen Durchmesser von 2 mm überschreiten, benötigen sie zur ausreichenden Versorgung die Ausbildung neuer Blutgefäße (21). Diesen Vorgang nennt man Neovaskularisierung oder Angiogenese. Hierbei muss die Proliferation von Endothelzellen induziert werden, Bereiche der extrazellulären Matrix müssen verdaut werden und die Endothelzellen müssen in Richtung Tumor migrieren (22). Dies wird durch Sekretion von Wachstumsfaktoren, sogenannten angiogenetischen Faktoren, durch die Tumorzellen erreicht. Angiogenetische Faktoren sind u.a. Mitglieder der *fibroblast growth factor*-Familie, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *transforming growth factor- α* (TGF- α), *heparin-binding growth factor* und Angiogenin. Besteht erst ein kapillares Netzwerk innerhalb des Primärtumors, können sich einzelne Zellen vom Tumor lösen und in die Gefäße eindringen.

Die Invasion der Tumorzellen ist wiederum eine Abfolge vieler Schritte (siehe Abb. 1.3). Diese umfassen Adhäsion der Zellen an Endothel und ECM-Komponenten, Deadhäsion von Tumorzellen und Keratinozyten, Migration/Motilität der Tumorzellen, um die Basalmembran zu überwinden und nicht zuletzt das Überleben im Blutstrom. Die Interaktion von Tumorzellen mit Endothelzellen wird u.a. durch die Expression des Adhäsionsmoleküls MCAM (*melanoma cell adhesion molecule*) auf der Zelloberfläche der Melanomzellen vermittelt. MCAM wird in invasiven Melanomen oft überexprimiert (23). Die Adhäsion der Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix basiert auf der Interaktion zwischen Integrinen auf der Oberfläche der Tumorzellen und Proteinen der ECM als Liganden der Integrine. Ein besonders in Melanomen dominierendes Integrin ist der Vitronektin-Rezeptor, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (24). Seine Liganden sind Vitronektin, Fibronektin und andere ECM-Proteine. Aber auch Nicht-Integrin-ECM-Rezeptoren, wie z.B. CD44, sind offenbar an der Metastasierung von Melanomen beteiligt (25). Um sich aus dem Tumorverband lösen zu können, müssen einzelne Tumorzellen die Zell-Zell-Verbindungen mit anderen Tumorzellen und umgebenden Keratinozyten unterbrechen (Abb. 1.3A). Eine entscheidende Rolle in Melanomen spielt dabei wahrscheinlich die Herunterregulation der Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin. E-Cadherin vermittelt in Melanozyten die Interaktion mit Keratinozyten (26), die wichtig ist für die Kontrolle der Proliferation und Differenzierung der Melanozyten. Wird kein E-Cadherin mehr exprimiert, lösen sich die Zellen von Keratinozyten und gleichartigen Zellen und es kommt u.a. zur verstärkten Expression von MCAM (27), was die Interaktion mit Endothelzellen begünstigt (Abb. 1.3B). *In-vitro*-Versuche ergaben, dass der Verlust der E-Cadherin-Expression die Invasivität von epithelialen Tumorzellen in dreidimensionalen

Kollagen-Gelen erhöht (28). Haben die Tumorzellen nun Verbindung mit den Kapillaren aufgenommen, müssen sie sich noch aktiv durch die extrazelluläre Matrix und Basalmembran hindurch bewegen, um in den Kreislauf einzudringen. Dazu müssen ECM und Basalmembranen proteolytisch verdaut werden, was zum großen Teil durch Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) geschieht, die von den Tumorzellen sezerniert werden (Abb. 1.3C). Hinzu kommt die aktive Zellbewegung durch Kontraktion, welche der Reorganisation des gesamten Zytoskeletts inklusive der Polymerisation von Aktinfilamenten bedarf. Die Fähigkeit zur Invasion erfordert die Koordination vieler, unterschiedlicher Zellaktionen, was die hohe Selektivität dieses Prozesses noch einmal verdeutlicht.

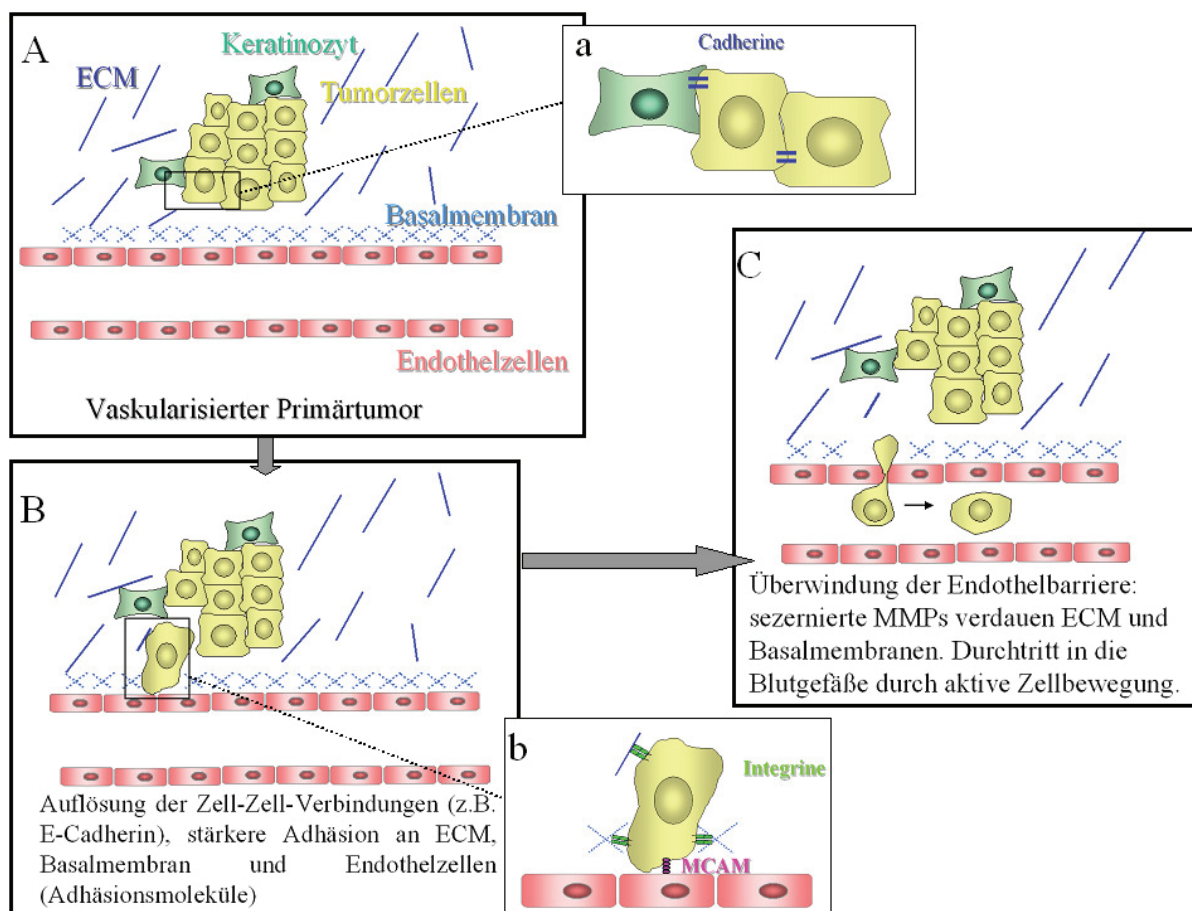


Abb. 1.3: Invasion von Tumorzellen ins Blutgefäßsystem. A) Die Tumorzellen sind über intra- und interspezifische Zell-Zell-Verbindungen im Tumor integriert, a) Cadherine vermitteln diese Zell-Zell-Interaktionen. B) Durch veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen wie Integrinen und MCAM (b) werden Tumorzell-Matrix-Interaktionen und Adhäsion an Endothelzellen unterstützt. C) Frei zirkulierende Tumorzelle

Befinden sich die Tumorzellen im Blut- oder Lymphstrom, müssen sie lange genug überleben, um an einem anderen Organ anzudocken. Tatsächlich sind aber weniger als 0,05% der zirkulierenden Tumorzellen dazu in der Lage, Metastasen zu bilden (29). Gründe dafür

sind z.B. Zerstörung der Zellen durch Scherkräfte innerhalb der Gefäße, Aggregation der Zellen oder Zelltod durch den Verlust der Adhäsion (Anoikis).

Der nächste Schritt der Metastasierung wird Extravasation genannt. Er beschreibt die Adhäsion der Tumorzellen an Endothelzellen des Kapillarbett, Bewegung durch die Basalmembran und Adhäsion an die ECM im Zielorgan. Die zellulären Prozesse hierbei entsprechen in umgekehrter Reihenfolge denen der initialen Invasion.

Zum Schluss müssen die Tumorzellen in der neuen Umgebung überleben und sich teilen, um Metastasen zu bilden. Dazu produzieren Melanomzellen autokrine Wachstumsfaktoren, z.B. bFGF (*basic fibroblast growth factor*) (30) und Interleukin-8 (31).

1.5 Das Tumorsuppressorprotein p73

Das wohl bekannteste Tumorsuppressorgen mit einer zentralen Bedeutung bei der Entstehung vieler Krebsarten ist p53. Dabei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Expression vieler Zellzyklus- und Apoptosegene als Antwort auf genotoxische Schäden und Stress reguliert (48, 49). Dieser Mechanismus der Checkpoint-Kontrolle sorgt dafür, dass es bei Schäden der DNA zum Arrest des Zellzyklus kommt und die Reparatur der DNA, bzw. bei irreparablen Schäden, der Tod der Zelle durch Apoptose eingeleitet werden kann. Kommt es durch Mutationen im Gen p53 zum Verlust der Tumorsuppressorfunktion, führt dies zur unkontrollierten Teilung der Zellen und zur Apoptoseresistenz. Tatsächlich ist das p53-Gen in bis zu 50 % aller menschlichen Tumoren mutiert und damit nicht funktionsfähig (50). In p53-negativen Zellen können sich DNA-Schäden in Form von Mutationen anhäufen. Dies kann eine Instabilität des Genoms zur Folge haben und damit zusätzlich zur Kanzerogenese beitragen. Aufgrund dieser fundamentalen Bedeutung von p53 für die Zelle, hielt man dieses Tumorsuppressorgen lange Zeit für einzigartig. Das änderte sich, als zwei neue p53-verwandte Gene, p63 und p73 entdeckt wurden (51-53).

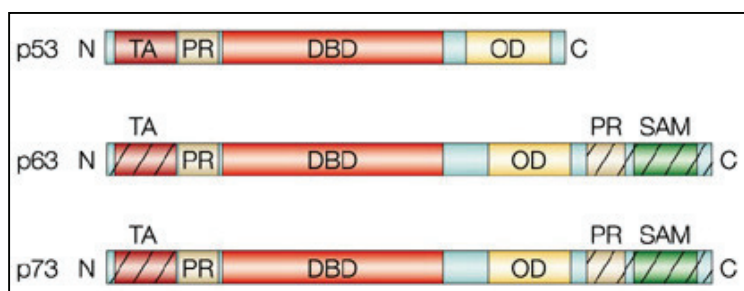


Abb. 1.4: Mitglieder der p53-Genfamilie (Quelle: Melino, Laurenzi und Vousden, Review: p73: Friend or Foe in Tumorigenesis, 2002)

Diese drei bilden zusammen die p53-Genfamilie (Abbildung 1.4). p63 und p73 weisen strukturelle Homologien zu p53 auf Gen- und Proteinebene auf. So ist allen das Vorhandensein einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TA), einer zentralen DNA-Bindungs-Domäne und einer C-terminalen Oligomerisierungsdomäne (51) gemein. Zusätzlich befinden sich am C-Terminus von p63 und p73 eine weitere Prolin-reiche Sequenz (PR) und eine SAM-Region. Die SAM-Region enthält ein steriles-alpha-Motiv, und spielt eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen (54).

Der Signalweg von p73 ist in Abbildung 1.5 dargestellt. Wie p53 wird p73 durch DNA-Schäden aktiviert. Daran beteiligt ist u.a. ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), welches die Tyrosinkinase c-Abl nach Einwirkung von Cisplatin oder ionisierender Strahlung (55-57) aktiviert, was dann wiederum zur Stabilisierung von p73 durch c-Abl führt (58). Darüber hinaus kann p73 auch durch Onkogene, wie E2F1, c-Myc und E1A aktiviert werden (54, 58).

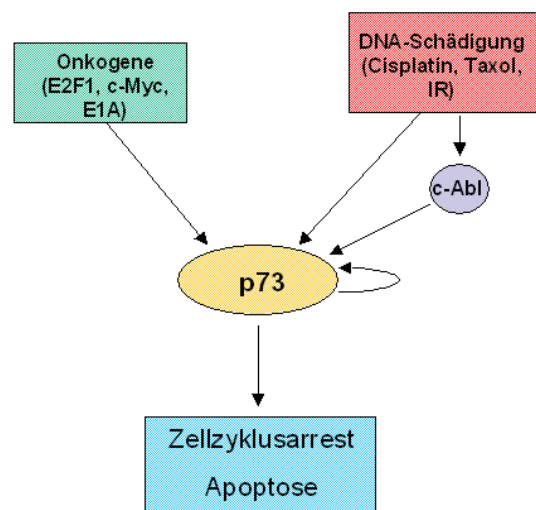


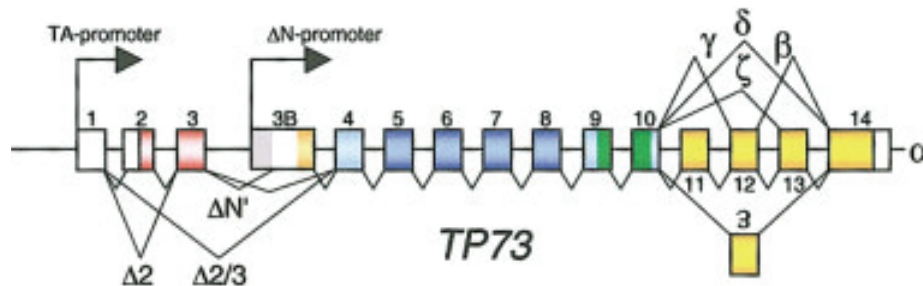
Abb. 1.5: p73-Signalweg nach Stiewe und Pützer, p73 in apoptosis, Apoptosis (2001)

Im Bereich der DNA-Bindedomäne liegt die Homologie zwischen p53 und p73 bei 63% (51), was die Vermutung nahe legt, dass p73 die gleichen Zielpromotoren wie p53 aktivieren und dementsprechend Zellzyklusarrest und Apoptose auslösen kann. Dies konnte schon experimentell in Säugerzellen bestätigt werden (51, 59, 60). Die Zielgene, die Zellzyklusarrest und Apoptose bewirken sind tatsächlich zum großen Teil p53-Targets, wie p21^{Waf1/Cip1}, Gadd45, 14-3-3σ, Bax, NOXA, PUMA u. v. m. (61, 62).

1.6 Die onkogenen Isoformen von p73 - $\Delta TAp73$

Vieles deutete darauf hin, dass p73 ein ebenso potenter Tumorsuppressor ist wie p53. Deshalb überraschten die Ergebnisse von Knockout-Experimenten in Mäusen. Bekanntermaßen entwickeln p53-defiziente Mäuse multiple spontane Tumoren, p73-defiziente Tiere hingegen zeigen keine Tumorneigung, weisen aber Entwicklungsdefekte auf, wie z.B. Fehlentwicklung des Hippocampus oder Entwicklung eines Hydrocephalus (33). Ebenfalls erwartete man den Funktionsverlust von p73 in Tumoren durch Mutationen des Gens wie es bei p53 der Fall ist. Aber es wurden nur wenige tumor-assoziierte Mutationen im p73-Gen gefunden (63). Stattdessen fand man erhöhte p73-Level in Tumoren verglichen mit umgebendem normalem Gewebe (63, 64). Das zerstörte das Bild von p73 als klassischen Tumorsuppressor und eröffnete die mögliche Rolle von p73 als Onkogen.

Es stellte sich heraus, dass bestimmte Isoformen von p73 existieren, die offensichtlich eine antagonistische Funktion zu p73 in der Zelle übernehmen. Yang et al. (33) entdeckten in der Maus eine p73-Variante, der die Transaktivierungsdomäne fehlt und die offensichtlich von einem alternativen Promoter in Intron 3 transkribiert wird. Dieses Transkript wurde $\Delta Np73$ genannt, da es einen verkürzten N-Terminus ausweist. Aufgrund der fehlenden Transaktivierungsdomäne kann dieses Transkript zwar noch an Zielpromotoren binden, diese aber nicht mehr aktivieren. Auf diese Weise kann $\Delta Np73$ die transkriptionelle Aktivität von p73 und p53 hemmen. Das entsprechende humane $\Delta Np73$ -Homolog wurde ebenfalls nachgewiesen (65). Zusätzlich fand man in Ovarialtumoren eine N-terminal verkürzte p73-Isoform, der das Exon 2 fehlte, die nur in Krebszelllinien und invasiven Tumoren exprimiert wurde (32). Diese entstand aber nicht durch Transkription vom alternativen ΔN -Promoter, sondern durch Nutzung des TA-Promoters und anschließendes Spleißen. Insgesamt gibt es drei bekannte N-terminale Spleiß-Isoformen von p73 (Abbildung 1.6), die vom TA-Promoter transkribiert werden: p73 Δ Exon2, p73 Δ Exon2/3 und $\Delta N'p73$ (66). Im weiteren werden sie als $\Delta TAp73$ bezeichnet, da allen das Fehlen der Transaktivierungsdomäne gemeinsam ist. Alle diese p73-Varianten üben einen dominant-negativen Effekt gegenüber den Wildty-p73- und p53-Tumorsuppressorproteinen aus (66), wodurch deren Transaktivierungsfähigkeit und die Induktion der p53/p73-vermittelten Apoptose gehemmt wird (67).



mRNA	promoter	protein	transactivation
TA-p73	TA	TA-p73	+ (TA)
p73Δex2		p73Δex2	
p73Δex2/3		p73Δex2/3	
ΔN'-p73	ΔN	ΔN-p73	- (ΔTA)
ΔN-p73			

Abb. 1.6: N- und C-terminale Spleißvarianten von p73. (Quelle: Stiewe et al., 2002: Transaktivationsdefizient Δ TAp73 Acts as an Oncogene)

Die Hemmung von p73 kann auf zwei unterschiedliche Weisen ablaufen: (1) durch kompetitive Bindung an die Zielpromotoren, d.h. Δ TAp73 blockiert den Promoter, indem es bindet, aber keine Transaktivierung stattfindet, und (2) durch die Bildung transaktivierungsdefizienter Hetero-Oligomere aus TAp73- und Δ TAp73-Monomeren (68). Für die Hemmung der p53-Funktion durch Δ TAp73 trifft nur die erste Möglichkeit - durch Kompetition um die DNA-Bindungsstellen - zu, da Δ TAp73 nicht an Wildtyp-p53 binden kann und es nicht zur Ausbildung von Hetero-Oligomeren mit Δ TAp73 und p53 (68) kommt. Neben der Hemmung des p53/p73-Weges beeinflussen die Δ TAp73-Varianten auch den zweiten großen Tumorsuppressorsignalweg, den RB/E2F-Weg. Die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins durch Δ TAp73 bewirkt eine verstärkte E2F-Aktivität und treibt somit die Tumorigenese voran (97). Durch diese Mechanismen üben die N-terminal verkürzten p73-Varianten ihre anti-apoptotische Funktion aus.

In einer Vielzahl von Tumorzelllinien und Tumorgewebe wurde eine Erhöhung der p73-Isoformen auf RNA- und Proteinebene gefunden (66, 98). In Melanomen (69) und hepatozellulären Karzinomen (70) konnten die verschiedenen Δ TAp73-Formen im Tumorgewebe verglichen mit normalem Gewebe in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden, im Fall des Melanoms fand man in Metastasen mehr Δ TAp73 im Vergleich zum Primärtumor (69). Dies deutet zusätzlich auf eine Rolle der N-terminalen Isoformen in der

Tumorprogression hin. Weiterhin finden sich erhöhte Level von N-terminal verkürzten p73-Isoformen in folgenden Tumorarten: Lungenkrebs (102), Prostata-Karzinom (103), Non-Hodgkins-Lymphom (104), Schilddrüsenkarzinom (105, 106), Kolon-Karzinom und Brustkrebs (78), Neuroblastom (107, 108) u. v. m. (101).

Die Überexpression von ΔTAp73 in NIH3T3-Mausfibroblasten führte zu deren Transformation, was sich in Koloniebildung der Zellen im Softagar und Tumorwachstum nach Injektion der Zellen in Nacktmäusen (66) äußerte. Ähnliche Ergebnisse erzielten Petrenko et al. 2003 (99), als es ihnen gelang, primäre embryonale Fibroblasten der Maus durch ektope Expression von ΔNp73 zu immortalisieren und die Proliferation und das Wachstum dieser Zellen im Softagar zu steigern. *In vivo* führte die leberspezifische Expression von ΔTAp73 in transgenen Mäusen zu erhöhter Hepatozyten-Proliferation und Leberkarzinomen (100).

Neben den diversen N-terminal verkürzten p73-Isoformen gibt es noch mindestens sieben verschiedene C-terminale Transkriptvarianten. Über das Schicksal einer Zelle entscheidet das vorliegende Verhältnis von pro-apoptotischen zu anti-apoptotischen p73-Isoformen.

1.7 p73 und Tumorprogression

Wie schon bereits erwähnt, findet sich in der Literatur die Assoziation von erhöhter p73-Expression und fortgeschrittener Tumorprogression. So gibt die Überexpression von p73 in hepatozellulären Karzinomen einen Hinweis auf eine schlechte Prognose der Patienten (72) und in Meningiomen auf fortgeschrittenes Tumorstadium (73). Auch für kolorektale Karzinome konnte ein Zusammenhang zwischen p73-Status, höherem Tumorstadium inkl. Metastasierung und kürzerer Überlebenszeit der Patienten hergestellt werden (74). Weitere Anzeichen für eine Beteiligung von p73 während der Metastasierung von Tumoren fand man in Plattenepithelkarzinomen des Halses und Nackens, wo p73-Expression mit dem Auftreten entfernter Metastasen korrelierte (75) und in kolorektalen Adenokarzinomen, in denen p73-positive Tumoren im Vergleich zu p73-negativen Tumoren stärker vaskularisiert waren (76). Für das humane maligne Melanom zeigten Zhang et al. (77) erhöhte p73-Proteinlevel in metastasierenden Melanomen aber nicht in Primärtumoren.

In all diesen Arbeiten war aber nie die Rede von den o.g. onkogenen p73-Isoformen. Es wurde allgemein die p73-Expression beschrieben, die vermutlich die Summe mehrerer pro- und anti-apoptotischer p73-Isoformen darstellt. Nur in wenigen Arbeiten wurde konkret die Rolle von ΔTAp73 in der Tumorprogression angesprochen. So konnte im Tumorgewebe von

hepatozellulären Karinomen verglichen mit gesundem Lebergewebe eine erhöhte Aktivierung des TA-Promoters und demzufolge ein Anstieg von TAp73 und Δ TAp73 nachgewiesen werden (70). Ähnliches entdeckten Dominguez et al. (78) in Tumorgewebeproben von Kolon- und Brustkrebspatienten. Sie assoziierten sogar die Hochregulation von Δ TAp73-Varianten mit fortgeschrittenem pathologischem Stadium, Lymphknotenmetastasen und vaskulärer Invasion.

Tuve et al. (69) untersuchten die Expression von TAp73 und den Δ TAp73-Isoformen in Gewebeproben von humanen malignen Melanomen verschiedener Stadien. So wurden gutartige melanozytäre Nävi, primäre Melanome und Melanommetastasen hinsichtlich ihrer Expressionslevel von p73 Δ Exon2, p73 Δ Exon2/3, Δ N'p73 und des Transkripts des alternativen Δ N-Promoters Δ Np73 miteinander verglichen. Die Analyse erfolgte auf mRNA-Ebene mittels Realtime-RT-PCR (siehe Abbildung 1.7).

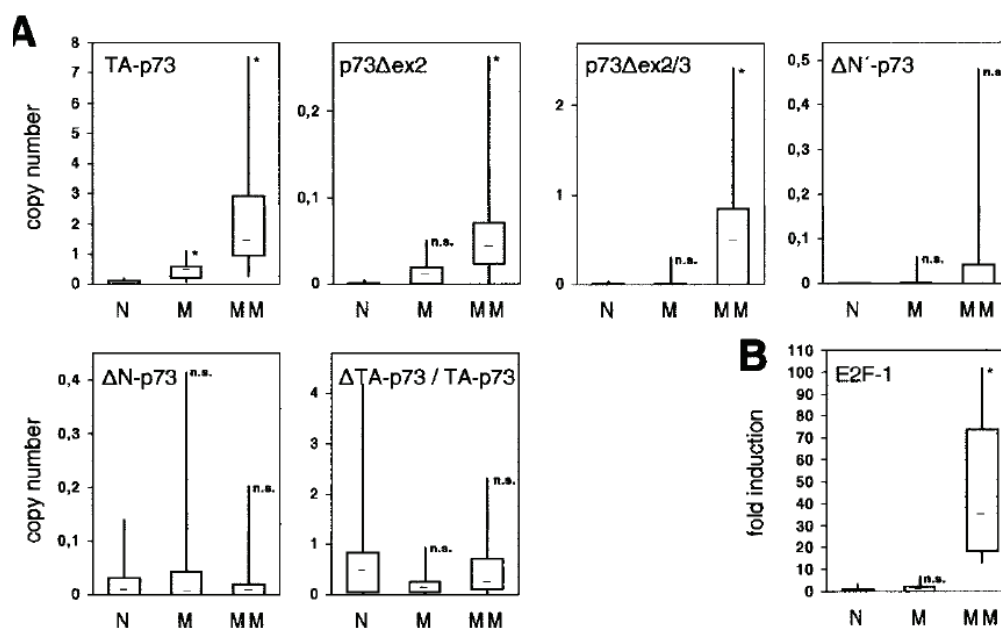


Abb. 1.7: Quantifizierung von p73 und E2F1-Transkripten in Melanomgeweben. N= melanozytärer Nävus, M= primäres Melanom, MM= Melanommetastase

Das Ergebnis dieser Experimente war eine signifikante Erhöhung der Transkripte des TA-Promoters in Melanommetastasen verglichen mit Nävi und Primärtumoren. D.h. sowohl das Volllängen-p73, TAp73, als auch die N-terminal verkürzten Isoformen p73 Δ Exon2 und p73 Δ Exon2/3 zeigten deutlich höhere mRNA-Level in den Metastasen. Insgesamt konnte zwar keine Verschiebung des Δ TAp73/TAp73-Verhältnisses auf mRNA-Ebene nachgewiesen

werden, dennoch könnte die Konzentration von Δ TAp73-Transkripten höher sein, z.B. durch höhere Stabilität der Δ TAp73-Proteine (68).

Diese Daten geben eindeutige Hinweise auf eine Beteiligung der transaktivierungsdefizienten p73-Isoformen in der Melanomprogression. Der Schritt des Übergangs vom primären zum metastasierenden Melanom ist kritisch und die Ursachen vielfältig. Das metastasierende Melanom zeigt eine starke Resistenz gegenüber systemischer Chemotherapie was eine sehr schlechte Prognose für den Patienten zur Folge hat. Ein Grund für die extreme Chemoresistenz der Melanome ist die hohe Resistenz gegenüber dem Zelltod durch Apoptose, v.a. im fortgeschrittenen Stadium der Melanomprogression (96). Die Apoptose-Resistenz erweist sich im Verlauf der Metastasierung mehrfach als nützlich, z.B. bei der Überwindung hämodynamischer Scherkräfte, des Immunsystems, des Zelltods infolge der Auflösung von Zell-Zell-Kontakten (Anoikis) und bei der Adaption an eine neue zelluläre Umgebung (109). Man kann daraus schlussfolgern, dass während der Tumorigenese ein Selektionsdruck in Richtung Apoptose-Resistenz auf die Zellen herrscht. Die Chemoresistenz wird im Melanom u.a. durch Apoptose-Defekte vermittelt, die sich die Zellen während der Tumorprogression aneignen. Dazu zählen aktivierte anti-apoptotische Faktoren wie Survivin (110), Inaktivierung von pro-apoptotischen Faktoren wie Apaf-1 (111) und die Verstärkung von Überlebenssignalen wie B-Raf (112). Ein Hauptsensor für apoptotische Stimuli, wie z.B. Chemotherapeutika, ist das Tumorsuppressorprotein p53, dessen Funktion durch Δ TAp73 inhibiert wird (58). Demnach können dominant-negative Δ TAp73-Varianten bei der Apoptose- und Chemoresistenz und bei der Melanomprogression bis hin zur Metastasierung beteiligt sein.

Wenn dies der Fall ist, würde ein Therapieansatz auf der Basis von Δ TAp73-Inhibition vermutlich zur Sensibilisierung der Primärtumoren und der Metastasen gegenüber Chemotherapie und zur Verbesserung der Überlebenschancen der Patienten beitragen.

1.8 Arbeitshypothese und Zielstellung

Basierend auf den o.g. Ergebnissen von Tuve et al. (69), sollte die Rolle von transaktivierungsdefizienten Δ TAp73-Isoformen während der Tumorprogression des malignen Melanoms aufgeklärt werden. Es wird postuliert, dass die Expression der Δ TAp73-Isoformen in ursächlichem Zusammenhang mit der Entstehung von Melanommetastasen steht. Demnach würde die Expression dieser Transkripte in nicht metastasierenden

Melanomzellen zur Entwicklung eines invasiveren Phänotyps führen. Dazu wurden zwei nicht metastasierende Melanomzelllinien dauerhaft mit einer Δ TAp73-Variante (p73 Δ Exon2/3 β) transfiziert und die Auswirkungen der Langzeitexpression dieses Transkripts auf das *in-vitro*-Verhalten der Zellen beobachtet. Der Schwerpunkt sollte auf Zelleigenschaften liegen, die bedeutend sind für die fortschreitende Tumorprogression, wie Zellproliferation, Zelladhäsion, Zellmigration, Zellinvasion, Apoptose-Resistenz und Organisation des Zytoskeletts. Durch die Microarray-Technik sollten die Genexpressionsmuster Δ TAp73-exprimierender, primär nicht metastasierender Melanomzelllinien mit denen der parentalen, nicht metastasierenden und der primär metastasierenden Zelllinien verglichen werden. Dies sollte Aufschlüsse über Signalwege geben, die zur Ausbildung des invasiveren Phänotyps führen könnten und die durch p73 bzw. Δ TAp73 reguliert werden. Auf diese Weise sollte ein komplexer Einblick in die Funktionsweise der transaktivierungsdefizienten p73-Formen (Δ TAp73) und deren Rolle bei der Melanomprogression gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Es wurden vier Melanomzelllinien verwendet. Mel 3 (SK-Mel-19) und Mel 5 (SK-Mel-29) sind nicht invasive Melanomzelllinien. Mel 9 (SK-Mel-103) und Mel 10 (SK-Mel-147) sind aggressive Melanomzelllinien, die nach intravenöser Injektion in Nacktmäuse experimentelle Lungenmetastasen bilden. Alle Zelllinien wurden aus Melanommetastasen von Patienten isoliert. Des Weiteren wurden von Mel 3 und Mel 5 abstammende stabile Zelllinien benutzt, die die transaktivierungsdefiziente Isoform p73 Δ exon2/3 β exprimieren.

2.1.2 Plasmide, Adenoviren

Zur Herstellung der Δ TAp73-exprimierenden stabilen Zelllinien wurde das Plasmid pIRESpuro2p73d2/3beta (kloniert von Thorsten Stiewe) verwendet. Als Kontrolle wurden Zelllinien benutzt, die den *backbone*-Vektor pIRESpuro2 (Clontech) stabil exprimieren. Der Vektor enthält eine *internal ribosome entry site* (IRES), die es ermöglicht, dass zwei offene Leserahmen (ORF) von einer mRNA translatiert werden. Dabei handelt es sich zum einen um den ORF für die Puromycinresistenz und zum anderen um das eingefügte Fremdgen (Δ TAp73).

Zur transienten Expression von Δ TAp73 wurde der Gentransfer mittels adenoviraler Vektoren durchgeführt. Dafür kamen AdGFP Δ TAp73, AdGFP, AdshGFP und Adshp73 zum Einsatz. Alle sind adenovirale Erstgenerationsvektoren, deren Expression unter der Kontrolle des CMV-Promoters steht. AdGFP Δ TAp73 exprimiert die p73-Isoform p73 Δ Ex2/3 β und GFP (grün fluoreszierendes Protein) als zwei unabhängige Expressionskassetten (Stiewe et al. 2002). AdGFP wurde als Kontrollvektor verwendet, um eventuell auftretende GFP-vermittelte Effekte auszuschließen.

Zur Hemmung der p73-Expression wurde Adshp73 (Buhlmann et al., 2008) verwendet, der eine *short hairpin* RNA (shRNA) exprimiert, die die Expression von Genen mittels RNA-Interferenz behindert. Der Kontrollvektor dafür ist AdshGFP (Stanelle et al., 2005) zur Inhibierung der GFP-Expression.

2.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper	Beschreibung	Firma	Anwendung
p73 (ER-15)	Monoklonal (Maus), reagiert mit humanen p73 α/β Isoformen (AS 367-380)	Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg)	Western Blot
Aktin (C-11)	Polyklonal (Ziege), reagiert mit C-Terminus von Aktin	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)	Western Blot
E-Cadherin	Monoklonal (Maus), Immunogen war die humane Brustkrebszelllinie T471	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)	Western Blot
Vimentin (V9)	Monoklonal (Maus)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)	Immunfluoreszenz
β -Catenin (clone 14)	Monoklonal (Maus), Immunogen AS 571-781 des murinen β -Catenins	Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg)	Immunfluoreszenz

Für Western Blots wurden Meerrettichperoxidase ('*horse radish peroxidase*', HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet: *sheep anti-mouse* (Amersham Biosciences, Freiburg) bzw. *bovine anti-goat* (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg). Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde *anti-mouse-Alexa-Fluor 488* (Morbitec) eingesetzt.

2.1.4 Chemikalien, Puffer und Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (Freiburg), Bio-Rad (München), Fermentas (St. Leon-Rot), Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), PAA (Pasching, Österreich), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München). Verwendete Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Standardprotokollen hergestellt (Sambrook et al., 1989). Restriktionsenzyme sowie DNA-modifizierende Enzyme wurden von Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) erworben.

2.1.5 Oligonukleotide

Für die semiquantitative Analyse der Genexpression mittels RT-PCR wurde die aus der mRNA gewonnene cDNA mit folgenden Primern (Metabion) amplifiziert.

Gen	Primername	Sequenz (5'→3')
S100 calcium binding protein A2	S100A2sense (neu) S100A2antisense (neu)	TGGTCTGCCACAGATCCA CCATGGCAGGAAGTCAAG
S100 calcium binding protein A4	S100A4_F: S100A4_R:	AACTTGACAGCAACAGGGACAAC TTGCTCAGCATCAAGCACGTGT
P73ΔExon2/3	ΔTAp73_sense ΔTAp73_antisense	GGCTGCGACGGCTGCAGGCC CAGGCGCCGGCGACATGG
Cadherin1, E-Cadherin	CDH1 sense CDH1 antisense	GCTTTGACGCCGAGAGCTACA TCCCAGGCGTAGACCAAGAAA
Matrix Metalloproteinase 8	MMP8sense MMP8antisense:	ATGTGACGGGGAAGCCAAATG GGATTCCATTGGGTCCATCAA
SEMA6A	SEMA6A_s SEMA6A_as	TTCTCAGGCTGATTTTCCTTCCC GGAGCCACCACACTTAAATGCTG
CHL1	CHL1 sense CHL1 antisense	TAGATGCACCCGTGTTTG AGCTTTGGCTGAACCCTA
Estrogen-Receptor 2	ESR2_sense: ESR2_antisense:	ACACCTGGGCACCTTTCTCC ACAAGGCGGTACCCACATCTC
Dipeptidyl Peptidase IV	DPP4_sense: DPP4_antisense:	GGCAGGAGCTGTGAATCCAAC TCCCGATGACTTCCCAGGTG
chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20_sense: CCL20_antisense:	TGCGGCGAATCAGAAGCA AACCTCCAACCCCAGCAA
ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	ENTPD1_s ENTPD1_as	AGGCATTTACCTGACTGATTGCA AGTAATCCAGCCATAGGCACCTTC
secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	SPP1_s SPP1_as	TGATGACCATGTGGACAGCCA GGTCATCCAGCTGACTCGTTTC
F1serpin peptidase inhibitor, clade F, member 1= Pigment epithelium-derived factor; PEDF	SerpinF1_s SerpinF1_as	TTACGAAGGCGAAGTCACCAAGTC TGTGTCTGTGTCCCTCAGTACGAA
carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	CEACAM1sense CEACAM1antisense	GCTGCACTGGTGCTAATGCC ATGCACAGTCCGTGTCAGGG
ribosomal protein S9	S9_sense S9_antisense	GATCAGAAGGACCCACGGCGT GAGACAATCCAGCAGCCCAGG
chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2sense CSPG2antisense	ACTGATGGCAGCACACTGCAA CGGCTCCAACGATGATCATG
Kollagen Typ XVIII	COL18A1-s COL18A1-as	GTCCAGCTGAGCGCCAGG CTGGCGCTGCCCTGAGTC
chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2_s CCL2_as	AGATGCAATCAATGCCCCAGTCAC TAGCTGCAGATTCTTGGGTTGTGG
Vinculin	Vinculin_F : Vinculin_R :	GACTCCAAACTGAACCAGGCCAAA CTTCAGCCAAAGCACCTCGAATCT
Integrin α6	Integrin_a6_sense: Integrin_a6_antisense:	CGAGACATCTTTGGGCGGTG TCAGCAAAACCACGGCTCC
transforming growth factor, beta 2	TGFB2_s TGFB2_as	GCAGAAGGCGAATGGCTCTC ATACGGGCATGCTCCAGCA
ADAM metallopeptidase domain 19	ADAM19_F: ADAM19_R:	GAAAGCCCCGTGAGAGAAAAGCAT AGCCACGAGGTAAAGCTCCACATA

2.1.6 Kits

Name	Firma
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences (Freiburg)
Effectene Transfection Reagent	
Omniscript RT Kit	
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
RNase-Free DNase Set	
RNeasy Mini Kit	
HotMasterMix 2.5x	Eppendorf (Hamburg) / 5 Prime (Hamburg)
Luciferase Assay System	Promega (Mannheim)
Nucleo-Bond	Macherey-Nagel (Düren)
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Pierce (Bonn)
TACS™ XTT Cell Proliferation Assay	Trevigen® (Gaithersburg, USA)
BioArray™ HighYield™ RNA transcript labeling kit	Enzo (USA)

2.1.7 Geräte

Gerätename	Geräteart	Hersteller
Axiovert 25	Mikroskop	Carl Zeiss (Göttingen)
Axiovert 40		
BioPhotometer	Fotometer	Eppendorf (Hamburg)
Celloshaker	Schüttler	Renner GmbH (Dannstadt)
Centrifuge 5415C	Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5415R	Tischzentrifuge	
Curix 60	Filmentwicklungsmaschine	AGFA Health Care (Berlin)
FACSCalibur	Durchflusszytometer	BD (Heidelberg)
GS Gene-linker™	UV-Kammer	
Hera Cell 240	CO ₂ -Inkubator	Heraeus (Osterode)
Hera Safe	Sicherheitskabinett	Kendro (Langenselbold)
iCycler	Thermozykler	Bio-Rad (München)
Lumat LB 9507	Luminometer	Berthold Technologies

Mastercycler gradient	Thermocycler	(Bad Wildbad) Eppendorf (Hamburg)
MicroCam 3.3	Digitalkamera	dhs (Greifenstein- Beilstein)
Mini-PROTEAN 3	System für vertikale Gelelektrophorese	Bio-Rad (München)
Multifuge 3L-R	Zentrifuge	Heraeus (Osterode)
MyCycler	Thermozykler	Bio-Rad (München)
S@feFlow 1.2	Zellkultur-Werkbank	Nunc (Wiesbaden)
Shaker TH15	Inkubationsschüttler	Edmund Buehler (Tübingen)
Sonoplus Ultrasonic Homogenizer HD3100	Ultraschall-Homogenisator	
Sub-Cell GT System	System für horizontale Gelelektrophorese	Bio-Rad (München)
Thermo mixer comfort	Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
Trans-Blot SD System	Blot-Kammer	Bio-Rad (München)
UV-Dokumentation	UV-Dokumentationsgerät	ITF Labortechnik (Wasserburg)
UV-Tisch	UV-Transilluminator	Vilber Lourmat (Eberhardzell)

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Arbeitstechniken

2.2.1.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration erfolgte photometrisch über die Extinktion einer wässrigen Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dazu wurden die Nukleinsäuren 1:100 mit Wasser verdünnt und in Quarzküvetten überführt. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Um die Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Protein abzuschätzen, wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt und das Verhältnis A₂₆₀/A₂₈₀ berechnet. Liegt dieser Wert bei DNA-Proben zwischen 1,6-2,0 und bei RNA-Proben zwischen 1,7-2,0 ist die Probe rein.

2.2.1.2 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Um die Transkriptmenge eines bestimmten Gens in verschiedenen Zellproben miteinander zu vergleichen, wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und genspezifische Fragmente der cDNA amplifiziert.

Für die Amplifikationsreaktion wurde der HotMasterMix der Firma Eppendorf bzw. 5 Prime (Hamburg) verwendet. Dieser enthält Taq-Polymerase, dNTPs, MgCl_2 und PCR-Puffer.

Der Standard-PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

cDNA-Template:	1 μl
HotMasterMix:	8 μl
Primer sense:	0,8 μl
Primer antisense:	0,8 μl
ddH ₂ O:	ad 20 μl

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler als sogenannte "Touchdown-PCR" nach folgendem Programm (T_M = Schmelztemperatur der Primer):

1) 95°C	5 min
2) 95°C	15 sek
3) $T_M + 2^\circ\text{C}$, (-0.5°C/Zyklus)	30 sek
4) 72°C,	1 min
5) 9x Schritte 2-4	
6) 95°C,	15 sek
7) $T_M - 3^\circ\text{C}$,	30 sek
8) 72°C,	1 min
9) 14-24x Schritte 6-8	
10) 72°C,	7 min
11) 4°C	∞

Um ein semi-quantitatives Resultat zu erhalten, wurde die niedrigste Anzahl an Zyklen verwendet, die nötig war, um ein deutliches Signal im linearen Bereich der Reaktion zu erhalten.

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese überprüft.

2.2.1.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel in horizontalen Elektrophoresekammern aufgetrennt. Es wurden bei einer Fragmentgröße von 300-500 Bp ein 1,5%-iges Agarosegel verwendet. Ein Agarosegel wurde aus 1x TAE-Puffer, Agarose und 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid hergestellt. Zunächst wurden die in TAE gelöste Agarose aufgekocht und nach dem Abkühlen auf etwa 50°C wurde das Ethidiumbromid zugefügt. Dann wurde die Lösung in einen Gelschlitten gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel in einer Elektrophoresekammer mit 1xTAE überschichtet, die Proben aufgetragen und 30 bis 60 min bei einer Spannung von 10-15 V/cm aufgetrennt. Die DNA wurde während der

Elektrophorese durch das Ethidiumbromid angefärbt und wurde anschließend durch UV-Licht sichtbar gemacht.

50x TAE-Puffer : 2 M Tris/Acetat
 150 mM EDTA pH 8,0

6x DNA-Probenpuffer: 0,03% (w/v) Bromphenolblau
 0,03% (w/v) Xylencyanol FF
 60% (v/v) Glycerin
 60 mM EDTA
 10 mM Tris-HCl (pH 7,6)

2.2.2 RNA-Arbeitstechniken

2.2.2.1 RNA-Extraktion

Die RNA aus den Zelllinien wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ der Firma QIAGEN isoliert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit einem Zellschaber von der Kulturgefäßoberfläche abgelöst. Das Zellpellet wurde in RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol resuspendiert und zur Homogenisierung auf eine QIA-Shredder-Säule der Firma QIAGEN gegeben. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte nach dem Protokoll „Isolation der Gesamt-RNA aus tierischen Zellen“ aus dem Handbuch des „RNeasy Mini Kits“. Dabei wurde zusätzlich die genomische DNA durch den Einsatz des RNase-free DNase Set (Qiagen) entfernt, um das PCR-Ergebnis nicht zu verfälschen. Im letzten Schritt der Aufreinigung wurde die RNA in 50 μ l RNase-freies Aqua bidest eluiert. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Reverse Transkription

Die Herstellung von cDNA aus zuvor isolierter Gesamt-RNA erfolgte durch Reverse Transkription mit dem Omniscript RT-Kit (Qiagen, Hilden). In einem 100 μ l PCR-Eppendorfgefäß wurden je 2 μ g RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12,5 μ l gebracht und mit je 7,5 μ l Master Mix auf 20 μ l aufgefüllt.

Der Master-Mix setzte sich wie folgt zusammen:

- 2 µl 10x RT-Puffer
- 2 µl Oligo-dT-Primer (10 µM)
- 2 µl dNTP-Mix (5 mM)
- 1 µl Reverse Transkriptase (4 U/µl)
- 0,5 µl RNasin (40 U/µl)

Der 20 µl-Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C im Thermocycler inkubiert, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend mit 20 µl Aqua bidest auf ein Endvolumen von 40 µl aufgefüllt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Lösungen bei –20°C aufbewahrt.

2.2.3 Protein-Arbeitstechniken

2.2.3.1 Proteinextraktion

Zur Gewinnung von Gesamtproteinextrakten aus kultivierten Zellen, wurden die Zellen mit Zellschabern vom Kulturgefäß gelöst, im Medium resuspendiert und in der Zentrifuge für 10 Minuten bei 1000 rpm sedimentiert. Das Zellpellet wurde, abhängig von der Anzahl der Zellen, in 50-200 µl RIPA-Puffer mit 1x Proteaseinhibitor-Cocktail (PI) Complete Mini (Roche) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Vom Überstand mit dem gelösten Protein wurde ein Aliquot für die Proteinkonzentrations-Bestimmung abgenommen und der Rest bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

RIPA-Puffer:

- 50 mM Tris/HCl pH 7,2
- 150 mM NaCl
- 0,1% (w/v) SDS
- 1% Na-Desoxycholat
- 1% Triton X-100

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration von Gesamtzellextrakten wurde mit Hilfe des Bradford-Assays (Bio-Rad, München) bestimmt. Hierzu wurde 1 µl Proteinextrakt mit 99 µl PBS, 700 µl Aqua dest und 200 µl 5x Bradford-Reagenz versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der Lösung bei 595 nm mit einem Photometer gemessen. Anhand einer BSA-Eichkurve mit bekannten Proteinkonzentrationen wurde die Konzentration errechnet.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese im diskontinuierlichen Puffersystem unter denaturierenden Bedingungen. Die Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Trenn- und Sammelgele erfolgte gemäß Sambrook et al. (1989). Eingesetzt wurden je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine 7,5-12,5%-ige Polyacrylamid-Gele. Die Protein-Proben (100-200 µg) wurden mit 1x Lane Marker Non-Reducing Sample buffer (Pierce, Bonn) sowie mit DTT (Endkonzentration 100 mM) gemischt und für 10 min bei 95°C denaturiert.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte im elektrischen Feld in einer MiniPROTEAN II Kammer (Bio-Rad) bei einer konstanten Spannung von 100 V für 2-4 Stunden (abhängig vom Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins).

5x SDS-Laufpuffer:

125 mM Tris
125 mM Glycin
0,5% (w/v) SDS

Sammelgel:

H ₂ O	6,4 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
10% SDS	100 µl
Acrylamid (40%)	1,0 ml
TEMED	11 µl
30% Ammoniumpersulfat	17 µl

Trenngel:

	8%	10%	12%
H ₂ O	5,4 ml	4,9 ml	4,4 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl
Acrylamid (40%)	2,0 ml	2,5 ml	3,0 ml
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl
30% Ammoniumpersulfat	17 µl	17 µl	17 µl

2.2.3.4 Western-Blot und Immundetektion

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham, Freiburg) übertragen. Dies geschah als *semi-dry blotting*-Verfahren mit Hilfe der Trans Blot SD-Zelle (Bio-Rad, München). Es wurde 90 Minuten bei 1,25 mA/cm Membranfläche geblottet. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in TBS mit 0,1% Tween-20 (TBST 0,1%) und 10% (w/v) Milchpulver blockiert. Die Primärantikörper wurden 1:200 bis 1:2000 in TBST 0,1% mit 5% (w/v) Milchpulver verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran mit TBST 0,1% entfernt. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden *horse radish peroxidase* (HRP) gekoppelten Zweitantikörper für eine Stunde inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte (dreimal mit TBST 0,1%, zweimal mit TBST 0,2% und einmal mit TBS). Die Chemilumineszenz des Zweitantikörpers wurde mit Hilfe des ECL Plus Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) detektiert. Die Chemolumineszenzfilme (Amersham Biosciences) wurden im Curix 60 (AGFA Health Care, Deutschland) entwickelt.

5x Transferpuffer: 970 mM Glycin
 125 mM Tris/HCl
 pH 8,3

10x TBS-Puffer: 200 mM Tris
 1,35 M NaCl
 pH 7,6

2.2.4 Zellbiologische Arbeitstechniken

2.2.4.1 Zellkultur

Alle verwendeten Melanomzelllinien wurden in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FBS (*fetal bovine serum*) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden alle 7 Tage passagiert, Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage. Zum Passagieren wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37°C und unter 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frisches Medium aufgenommen und i.d.R. 1:10 auf neue Kulturgefäße gesplittet. Im

Flüssigstickstoff gelagerte Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, abzentrifugiert, das Zellpellet in 10 ml Medium aufgenommen und in Zellkulturschalen überführt. Zur Lagerung in Flüssigstickstoff wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch Trypsin/EDTA gelöst und in Medium, ergänzt mit 10% DMSO, resuspendiert. Dann wurden die Zellen in speziellen Kryoboxen (Kühlmittel Isopropanol) langsam bis auf –70°C heruntergekühlt und anschließend in den Flüssigstickstoff überführt.

2.2.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämatozytometers (nach Neubauer) bestimmt. Dabei wurden 20 µl einer 10 ml Zellsuspension mit 70 µl PBS und 10 µl Trypanblau gemischt. Davon wurden 10 µl auf ein Hämatozytometer aufgetragen. Die vitalen Zellen, die den Farbstoff Trypanblau nicht aufnehmen, wurden in der Zählkammer gezählt und die Anzahl der Zellen pro ml mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Durchschnittliche Zellzahl} \times \text{VD} \times 10^4 = \text{Zellen pro ml}$$

2.2.4.3 Stabile Transfektion

Die nicht metastasierenden Melanomzelllinien Mel 3 und Mel 5 wurden mit dem Expressionsplasmid pIRESpuro2-p73D2/3b bzw. für die Kontrolle mit pIRESpuro2 stabil transfiziert. Dazu wurden 1×10^6 Zellen mit 5 µg des zuvor mit dem Restriktionsenzym *Xho*I linearisierten, aufgereinigten Plasmids transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit dem Effectene Transfection Reagent Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Nach zwei Tagen Inkubation wurden die Zellen von einer 6-cm-Platte auf zehn 10-cm-Kulturplatten gesplittet und nach weiteren zwei Tagen wurde mit der Selektion auf Puromycin-Resistenz begonnen. Dazu wurden dem Kulturmedium 0,25 µg/ml Puromycin zugefügt. Die erfolgreich transfizierten Zellen konnten somit überleben und die untransfizierten Zellen starben. Nach 3-4 Wochen waren einzelne Kolonien (Klone) entstanden, die dann mit einer Pipettenspitze vorsichtig in 24-Well-Platten überführt wurden. Die einzelnen Klone wurden unter dauerhafter Puromycin-Gabe kultiviert, um die stabil transfizierten Zellen zu selektieren.

2.2.4.4 Transduktion von Zellen mit adenoviralen Vektoren

Um einen Gentransfer in die Melanomzelllinien mittels adenoviralen Vektoren durchführen zu können, wurde für jede Zelllinie zunächst die entsprechende Infektionsmultiplizität (MOI) bestimmt. Der MOI sagt aus, mit wie vielen Viruspartikeln eine Zelle erfolgreich zu 100%

transduziert wird. Für die Transduktion wurden die Zellen vorher gezählt. Dann wurde das Kulturmedium entfernt und die Vektoren in kleinstem Volumen (ca. 5% des Ausgangsvolumens) Kulturmedium auf die Zellen gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Restmenge Medium zu den Zellen gegeben.

2.2.4.5 Colony formation Assay

Um das Wachstum der Zellen im Softagar zu analysieren, wurden 3×10^4 Zellen in 1 ml 2xDMEM mit 30% FBS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 1 ml 0,7% Agarose (Invitrogen) gemischt. Diese Mischung wurde in 6-Well-Platten auf einen Grundagar, der zu gleichen Anteilen aus 1% Agarose und 2xDMEM besteht, gegeben. Nach drei-wöchiger Inkubationszeit wurden die Kolonien, die aus mindestens drei Zellen bestanden im Mikroskop betrachtet und gezählt. Die Versuche wurden als Doppelansatz durchgeführt.

2.2.4.6 In-vitro-Invasionsassay (Boyden-Chamber-Assay)

Die dreidimensionale Invasivität der Melanomzelllinien wurde mit Hilfe eines modifizierten *Boyden-Chamber*-Assays analysiert. Dazu wurden Polyethylen-Terephthalat-Membranen der Firma BD (erhältlich als *cell culture inserts*) mit 8 µm großen Membranporen mit Matrigel™ Basalmembran-Matrix (Fa. BD Biosciences) beschichtet. Das Matrigel™ wurde dazu 1:3 mit kaltem, serumfreien Kulturmedium verdünnt, die Endkonzentration betrug 3,1 mg/ml Matrigel™. Abbildung 2.1 zeigt den Aufbau einer *Boyden Chamber*. Auf die beschichtete Membran wurden die Zellen ausgebracht. Für ein 6-Well-Insert wurden i.d.R. 1×10^5 Zellen ausgesät. Diese wurden zuvor trypsinisiert, in serumfreies Medium aufgenommen und gezählt. In der oberen Hälfte der *Boyden Chamber* befindet sich serumfreies Medium, in die untere Kammer wird serumhaltiges (10%) Kulturmedium eingefüllt, dieses dient als Chemoattraktant für die Zellen.

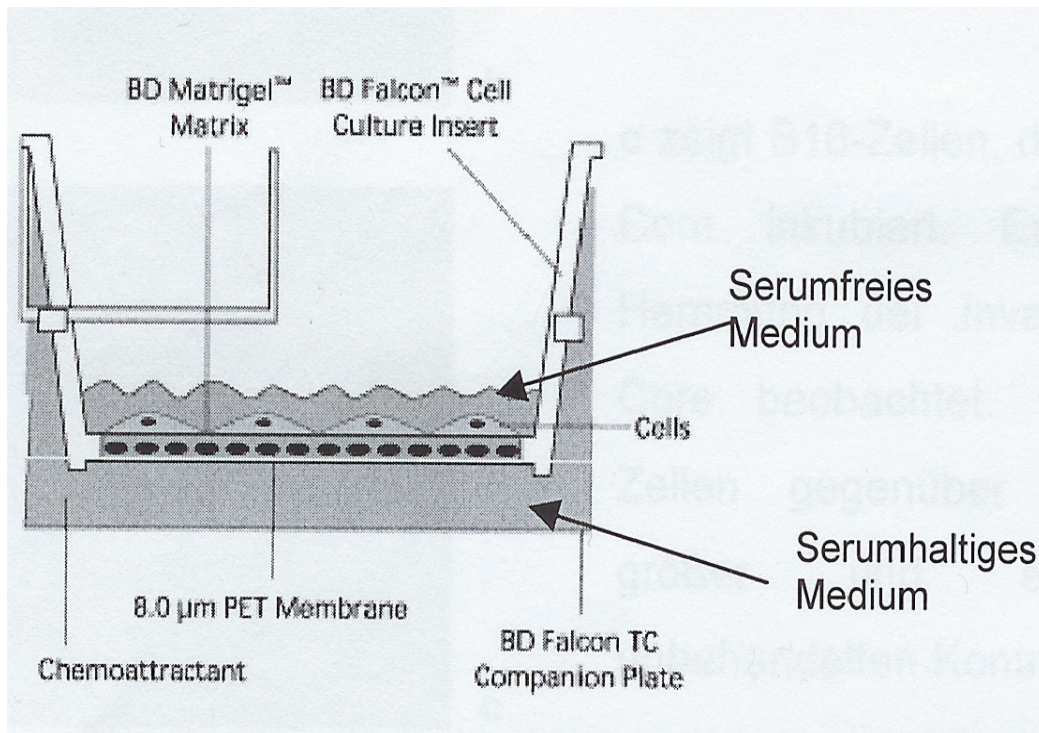


Abb. 2.1 Aufbau einer *Boyden Chamber*

Die Zellen wurden in den *Boyden Chambers* für drei Tage bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen auf der Oberseite der Membran vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt, und die Zellen, die auf die andere Seite der Membran gewandert waren mit Methanol abs. fixiert und mit DAPI (Fa. Roche) angefärbt. Pro Membran wurden fünf Felder im Mikroskop fotografiert und die Zellen ausgezählt. Dabei wurden bei jeder Membran die gleichen Bereiche analysiert (siehe Abbildung 2.2).

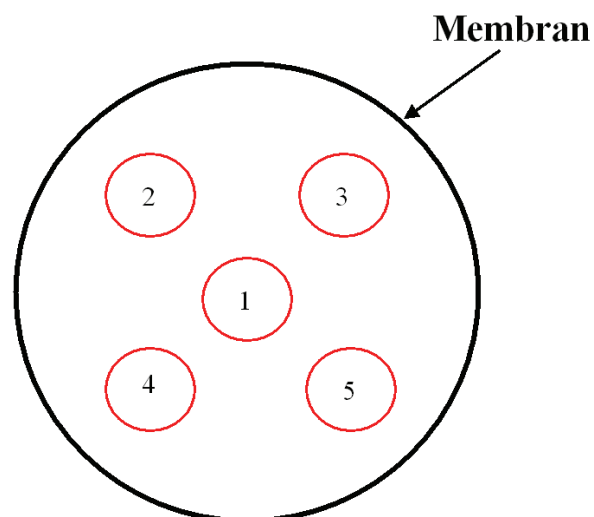


Abb. 2.2 Die Auszählung der Zellen auf den Membranen erfolgte immer nach dem gleichen Schema. Es wurden immer fünf Felder in dieser Anordnung ausgezählt.

2.2.4.7 In-vitro-Migrations-Assay (*Scratch* Assay)

Für die Untersuchung der zweidimensionalen Migrationsfähigkeit von Zellen, wurde der Scratch-Assay, auch *Wound-Healing*-Assay genannt, eingesetzt. Dafür wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. In die Monolayer wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine Wunde gekratzt und die abgelösten Zellen mit PBS abgespült. Die Einwanderung der Zellen in den Spalt wurde über mehrere Tage dokumentiert. Die Experimente wurden als Doppelansatz durchgeführt.

2.2.4.8 Anoikis-Assay

Um zu testen, ob die Melanomzellen durch die ektope Expression von Δ TAp73 eine erhöhte Resistenz gegen Anoikis (=Zelltod durch Verlust von Zell-Matrix-Kontakten) entwickeln, wurden die Zellen unter nicht adhärenenten Bedingungen kultiviert. Dies wurde erreicht, indem die Zellen auf polyHEMA-beschichteten 96-Well-Platten kultiviert wurden. PolyHEMA (poly-2-hydroxyethylmethacrylate, Sigma, Germany) verhindert die Anheftung von Zellen an den Boden des Kulturgefäßes. 96-Well-Platten wurden mit 50 μ l einer PolyHEMA-Lösung (Endkonzentration 12 mg/ml, Stocklösung 60 mg/ml) beschichtet. Die Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und vor Gebrauch dreimal mit PBS gewaschen. Für das Experiment wurden pro Well 4×10^3 Zellen ausgesät und für ein bis drei Tage kultiviert. Unbeschichtete Platten wurden als Kontrolle verwendet. Anschließend wurde die Vitalität der Zellen mit Hilfe des XTT-Assays (Kit: TACS™ XTT Cell Proliferation Assay, Trevigen®) bestimmt. Die Messung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die photometrische Bestimmung des umgesetzten XTT erfolgte nach vier Stunden im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm gegen den Referenzwert von 690 nm. Pro Probe wurden fünf Ansätze gefahren.

2.2.4.9 Zelladhäsionsassay

Die Adhäsionseffizienz der verschiedenen Zelllinien an die extrazellulären Matrix-Komponenten Laminin und Fibronectin wurde *in vitro* untersucht. Dazu wurden 24-Well-Platten mit je 200 μ l einer Lamininlösung (Fa. Sigma) mit einer Endkonzentration von 5 μ g/ml, bzw. mit Fibronectin (Fa. BD Biosciences) mit einer Enkonzentration von 25 μ g/ml beschichtet. Unbeschichtete Kulturplatten wurden als Kontrolle verwendet. Pro Well wurden $1,3 \times 10^5$ Zellen ausgesät und für vier bis acht Stunden inkubiert. Anschließend wurden die nicht angehefteten Zellen mit PBS abgewaschen und die adhärenenten Zellen in 10% Formaldehyd fixiert und mit 0,1% Kristallviolett in 25% Methanol gefärbt. Nach dreifachem

Waschen der fixierten Zellen mit Aqua dest. wurden die Zellen mit 2% SDS lysiert. Dabei wird der Farbstoff aus den Zellen ins Medium abgegeben. Die Farbintensität, die mit der Zellzahl korreliert, wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Alle Experimente wurden als Dreifachansatz durchgeführt.

2.2.4.10 Durchflusszytometrie-Analyse (Quantifizierung apoptotischer Zellen durch Propidium-Iodidfärbung)

Die Zellen wurden zunächst mit Cisplatin (cDDP) oder Adriamycin (ADR) behandelt. Dazu wurden dem Kulturmedium 7,5 µg/ml cDDP bzw. 1 µg/ml ADR zugesetzt. Die Konzentrationen wurden in Vorexperimenten bestimmt, in denen ansteigende Zytostatika-Konzentrationen hinsichtlich ihres apoptotischen Effekts getestet wurden. 24 bis 72 Stunden nach Zugabe der Zytostatika wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen samt Zellkulturüberstand gesammelt und abzentrifugiert (10 min bei 4°C und 1200 rpm). Anschließend wurde das Zellpellet mit eiskaltem PBS gewaschen und zentrifugiert (10 min bei 4°C und 1200 rpm) und dann in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Nun wurden die Zellen unter Vortexen mit 10 ml eiskaltem 70%-igen Ethanol fixiert und 24 Stunden bis 4 Wochen bei –20°C gelagert. Die fixierten Zellen wurden zentrifugiert (10 min bei 4°C und 3000 rpm), das Ethanol sorgfältig abgenommen und das Pellet mit eiskaltem PBS gewaschen (Zentrifugation jeweils 10 min bei 4°C und 3000 rpm). Anschließend wurden die Zellen in 500 µl PI-Färbelösung (1 mg/ml Propidiumiodid, 100 µg/ml RNase A in PBS) für mindestens 30 Minuten (dunkel, 4°C) inkubiert.

Das Prinzip dieser Apoptosemessung beruht auf der Färbung der Kern-DNA durch Propidiumiodid. Fixierte apoptotische Zellkerne erscheinen im FACS als hypodiploider DNA-Peak (Sub-G1-Peak). Sie zeigen eine geringere Rotfluoreszenz aufgrund ihres verminderten DNA-Gehalts, da fragmentierte DNA während der Ethanol-Behandlung durch die permeabilisierte Zellmembran austreten kann. Die FACS-Analyse wurde mit dem FACSCalibur-Durchflußzytometer (Becton Dickinson, San Diego, USA) durchgeführt. Pro Messung wurden die Daten von 10.000 Zellen erfasst und mit der CellQuest™ Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

2.2.4.11 Immunfluoreszenz

Für die Immunfärbung von Vimentin und β-Catenin wurden 4×10^5 Zellen auf Deckgläschen in 6-Well-Platten ausgesät. Die Deckgläschen waren zuvor für eine Stunde mit FBS

beschichtet worden. Die Zellen konnten dann 48 Stunden im Brutschrank inkubieren. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in eiskaltem Aceton für eine Minute fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit dem Primärantikörper über Nacht inkubiert. Die Antikörper wurden 1:150 in PBS mit 1% BSA und 0,2% Triton X-100 verdünnt. Danach wurden die Deckgläschen dreimal je 5 Minuten mit PBS gewaschen und dann für eine Stunde mit dem 1:1000 verdünnten Sekundärantikörper (anti-mouse-Alexa-Fluor 488, Mobitec) inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid (Endkonzentration 5 µg/ml, Sigma) gegengefärbt. Zur Langzeiterhaltung der Fluoreszenz wurden die Deckgläschen mit einem Eindeckmedium (Mobitec) überschichtet und auf Objektträger übertragen. Die Dokumentation der gefärbten Zellen erfolgte durch konfokale *laser scanning*-Mikroskopie (LSM 410, Carl Zeiss, Jena, Germany) unter Benutzung eines Argon-Ionen-Lasers.

2.2.4.12 Aktinfärbung mit Phalloidin/TRITC

Für die Färbung des Aktin-Zytoskeletts wurde mit TRITC konjugiertes Phalloidin (Sigma) verwendet, das an polymeres und oligomeres Aktin bindet. Die Behandlung der Zellen erfolgte bis einschließlich der Fixierung mit Aceton wie bei der Immunfluoreszenz. Dann wurden die Deckgläschen mit 1:100 in PBS verdünntem Phalloidin/TRITC (Endkonzentration 10 µg/ml) inkubiert. Die weitere Behandlung der Proben und die Dokumentation erfolgte dann wie in Abschnitt 2.2.4.11 erläutert.

2.2.5 Oligonukleotid-Microarray Analyse

2.2.5.1 GeneChip®-Arrays/ GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array

Die Transkriptomanalyse wurde mit der GeneChip®-Technologie der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) durchgeführt. *High density* Oligonukleotid-Microarrays, wie der GeneChip®, ermöglichen eine gleichzeitige Expressionsanalyse von Tausenden von Genen. Für diese Arbeit wurde der HG U133 Plus 2.0 GeneChip® Array verwendet. Dieser beinhaltet 54.000 *probesets* und ermöglicht die Analyse von 47.000 Transkripten und Transkriptvarianten bzw. von 38.500 humanen Genen. Die Oligonukleotidsonden werden *in situ* auf dem Array synthetisiert. Eine Sonde (*probe*) besteht aus einer 25 Nukleotide langen definierten Sequenz, die mit dem 3'-Ende des Transkriptes eines bestimmten Gens hybridisiert.

Ein *probeset* setzt sich zusammen aus 11 Sonden für ein Transkript mit jeweils dazugehöriger Negativkontrolle (*mismatch probe*).

2.2.5.2 cRNA-Präparation, Array-Hybridisierung und Datenprozessierung

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den Zelllinien erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben. Es wurden für die Proben Mel5- Δ TAp73 versus Mel5 jeweils drei Replikate hergestellt (d.h. drei Chips pro Probe) und für die Proben Mel3 und Mel5 versus Mel9 und Mel10 jeweils zwei Replikate pro Probe. Die weiteren Schritte erfolgten in einer Zusammenarbeit mit Dr. Dirk Koczan vom Institut für Immunologie, Universität Rostock. Die in der Gesamt-RNA enthaltenen mRNAs wurden mit Hilfe eines T7-Oligo(dT)₂₄-Promotorprimers und des Enzyms SuperScript™ II reverse Transkriptase (Invitrogen, USA) zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde der komplementäre cDNA-Strang durch DNA-Polymerase I, DNA-Ligase und RNaseH synthetisiert. Die Einführung der T7-Promotersequenz in die cDNA ermöglicht in einer sogenannten *in vitro*-Transkriptionsreaktion mit Hilfe von T7-RNA-Polymerase (BioArray™ HighYield™ RNA transcript labeling kit, Enzo, USA) die Umschreibung der cDNA in biotinylierte Antisense-cRNA, die komplementär zu den auf dem Chip enthaltenen Sonden ist. Die Biotinylierung der cRNA erfolgte dabei durch den Einsatz von biotinylierten UTP-Nukleotiden. Da jedes cDNA-Molekül viele Male abgeschrieben wird, kommt es in diesem Schritt zu einer linearen Amplifizierung, wodurch erst genügend Material für die Hybridisierung gewonnen wird. Die Biotin-markierten cRNAs wurden nach Fragmentierung auf den Array hybridisiert (Hybridisierungsöfen: GeneChip® Hybridization Oven 640). Nach dem Auswaschen nicht-komplementärer cRNAs wurden die gebundenen komplementären cRNAs mit Streptavidin-Phycoerythrin und biotinyliertem anti-Streptavidin-Antikörper gefärbt. Die Fluoreszenzintensität wurde in einem speziellen Laserscanner (GeneChip® Scanner 3000) gemessen und quantifiziert.

Die Intensität der Fluoreszenzsignale der *probe cells* wurde mit Hilfe der MAS5-Funktion der Software R/Bioconductor *affy* package (www.r-project.org/www.bioconductor.org) berechnet. Mit diesem erfolgte auch die Hintergrund-Subtraktion. Die anschließende Normalisierung aller Arrays bewirkt die uneingeschränkte Vergleichbarkeit aller Arrays miteinander, unabhängig von individuellen technischen und experimentellen Parametern. Für jedes *probeset* wird mit Hilfe der Fluoreszenzintensität die Expressionshöhe als absolutes Signal berechnet. Zusätzlich zum absoluten Signalwert wird abhängig von bestimmten

Schwellenwerten jedes *probeset* als *present* (d.h. exprimiert), *marginal* (d.h. gering exprimiert) oder *absent* (d.h. nicht exprimiert) gekennzeichnet. Mit diesen Absolutwerten wurden weitere statistische Berechnungen und letztlich die Vergleiche der Expressionsmuster der verschiedenen Proben durchgeführt.

2.2.5.3 Auswertung der Array-Daten

Alle weiteren Berechnungen, d.h. die statistische Auswertung, Datenfilterung und Clustering wurden mit Hilfe der Software GeneSpring GX 7.3.1 durchgeführt. Zunächst wurden die Arrays nochmals normalisiert. Dabei wurde zum einen per Chip über den Median aller *probesets* normalisiert und zum anderen per Gen über den Median aller Arrays. *Probesets*, die auf allen Arrays als *absent* galten, wurden dann herausgefiltert, um die Anzahl falsch-positiver Gene zu reduzieren. Um differentiell exprimierte Gene zu bestimmen, wurden die Arrays in Gruppen eingeteilt. Es wurden vier Gruppen gebildet, die in zwei zunächst unabhängigen Analysen verglichen wurden (siehe Abb.2.3).

Analyse 1:

- 1) Mel5- Δ TAp73 (primär nicht metastasierende Zelllinie Mel5, die stabil Δ TAp73 exprimiert, je als Dreifachansatz)
- 2) Mel5-Kontrolle (primär nicht metastasierende Zelllinie Mel5 ohne ektope Expression von Δ TAp73, je als Dreifachansatz)

Analyse 2:

- 3) Metastasierende Zelllinien (Mel9 und Mel10, je als Doppelansatz)
- 4) Nicht metastasierende Zelllinien (Mel3 und Mel5, je als Doppelansatz)

Dann erfolgte die statistische Auswertung mittels T-Test über die Gruppen. Gene mit einem p-Wert $\leq 0,05$ und einer mindestens 2-fachen Expressionsänderung wurden ausgewählt. In Analyse 1 wurden die Gene bestimmt, die in der nicht metastasierenden Zelllinie durch die Expression von Δ TAp73 hoch- bzw. herunterreguliert wurden. In Analyse 2 wurden die Gene identifiziert, die in metastasierenden Melanomzellen im Vergleich zu nicht metastasierenden differentiell exprimiert werden. Nun wurde ein Kreuzvergleich zwischen beiden Analysen durchgeführt und die Schnittmenge von *probesets*, die in beiden Analysen differentiell reguliert werden, bestimmt. Aus dieser Schnittmenge wurden dann noch die Gene herausgefiltert, die eine Funktion bei der Tumordinvasion ausüben. Dies wurde erreicht, indem nur Gene ausgesucht wurden, deren Funktionen unter den Begriffen Zellmotilität,

Zelladhäsion, Angiogenese, Aktin-Zytoskelett, Zellorganisation und Biogenese, EGFR-Signalweg, TGFB-Signalweg oder Wnt-Rezeptor-Signalweg annotiert sind.

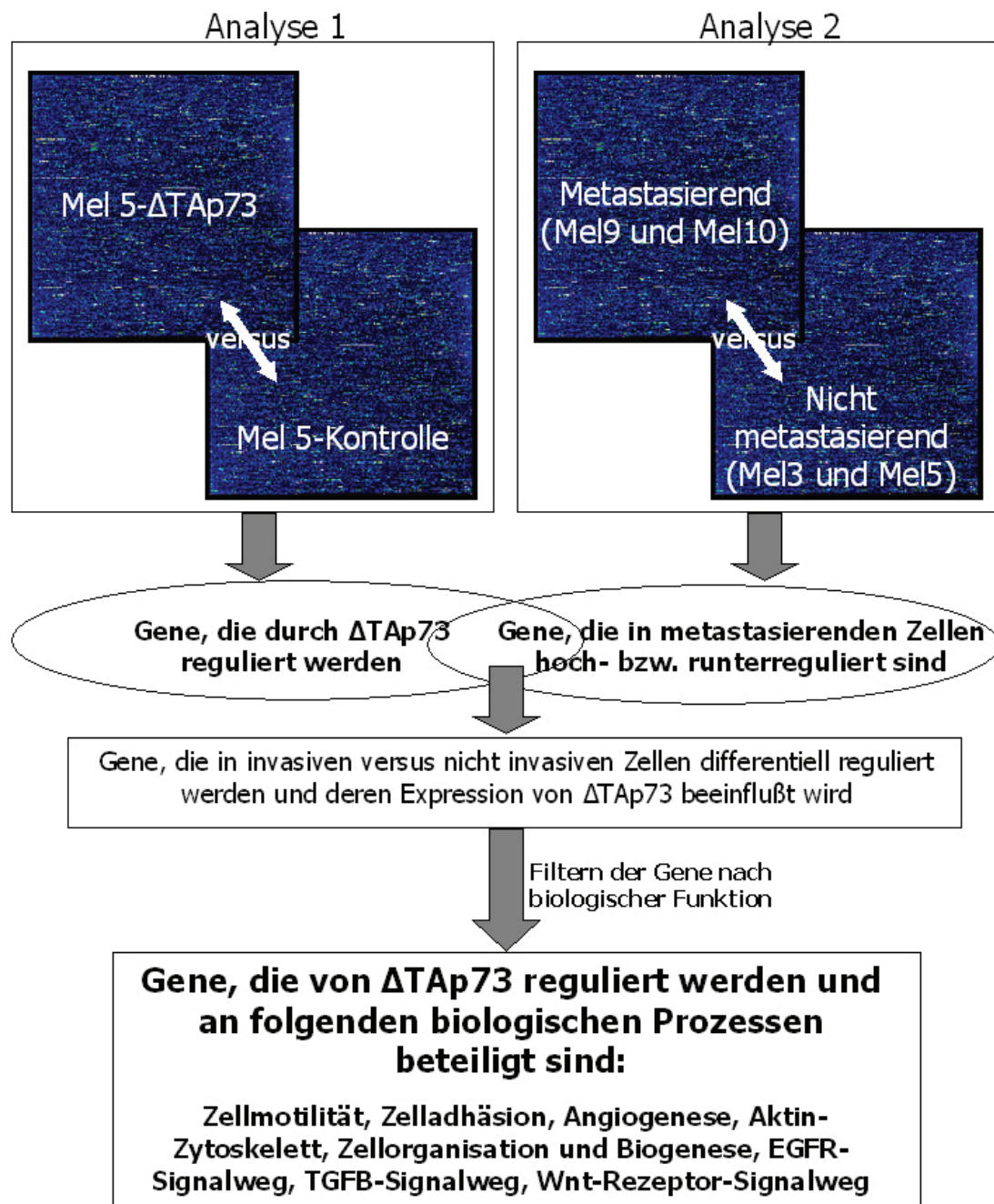


Abb. 2.3 Schema für die Auswertung der Microarrays.

Auf diese Weise sollten aus den beiden Array-Analysen die Gene bestimmt werden, die die Tumorprogression von Melanomzellen in Richtung Invasion und Metastasierung beeinflussen und die durch Δ TAp73 reguliert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Exogene Expression von $\Delta TAp73$ in nicht metastasierenden humanen Melanom-Zelllinien

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss einer N-terminal verkürzten Isoform des Tumorsuppressors p73 auf zelluläre Prozesse, die während der Tumورprogression in Richtung Metastasenbildung von Bedeutung sind, zu untersuchen. Dazu sollte die Isoform p73 Δ Exon2/3 β (im weiteren als $\Delta TAp73$ bezeichnet), der weite Bereiche der Exons 2 und 3 und damit die transkriptionelle Transaktivierungsdomäne des Proteins p73 fehlen, stabil in humane Melanom-Zelllinien eingebracht werden. Es wurden Zelllinien ausgewählt, die *in vivo* nicht metastasieren. Diese wurden in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe von M. Soengas genauer beschrieben (79). Es handelt sich dabei um die Zelllinien SK-Mel-19 und SK-Mel-29, die aber im weiteren Verlauf Mel 3 und Mel 5 genannt werden. Als Vergleichszelllinien dienten die metastasierenden Zelllinien SK-Mel-103 und SK-Mel-147 (weiterhin Mel 9 und Mel 10), die ebenfalls von Soengas et al. beschrieben worden sind. Alle diese Zelllinien stammen von Melanommetastasen aus Patienten ab. Sie weisen jedoch stark variierende Eigenschaften bezüglich ihres Verhaltens *in vitro* auf.

Zunächst wurden Mel 3 und Mel 5 mit dem Expressionsplasmid pIRESpuro2-p73 Δ Exon2/3 β transfiziert und anschließend einzelne Klone unter Puromycin-Selektion isoliert. Die Expression des Transgens wurde durch RT-PCR und Western Blot in einer Reihe von Zellklonen (20 bis 30 Klone pro Zelllinie) getestet. Abbildung 3.1 zeigt die RNA (A)- und Proteinbanden (B) jeweils zweier positiver Klone von Mel 3 und Mel 5. Dabei zeigen sich auf Proteinebene durchaus Unterschiede in der Quantität der Genexpression. So bilden Klon 1 von Mel 3 und Klon 2 von Mel 5 deutlich mehr Protein als der jeweils andere Klon derselben Zelllinie. Diese Klone wurden für die folgenden Experimente verwendet. Als Kontrolle wurden Mel 3- und Mel 5- Klone benutzt, die mit dem leeren Expressionsplasmid pIRESpuro2 transfiziert worden sind, und auf die gleiche Weise selektiert und kultiviert wurden wie die $\Delta TAp73$ -exprimierenden Klone. Zusätzlich wurden alle weiteren Experimente i.d.R. mit mindestens zwei Klonen durchgeführt, um unspezifische Effekte ausschließen zu können.

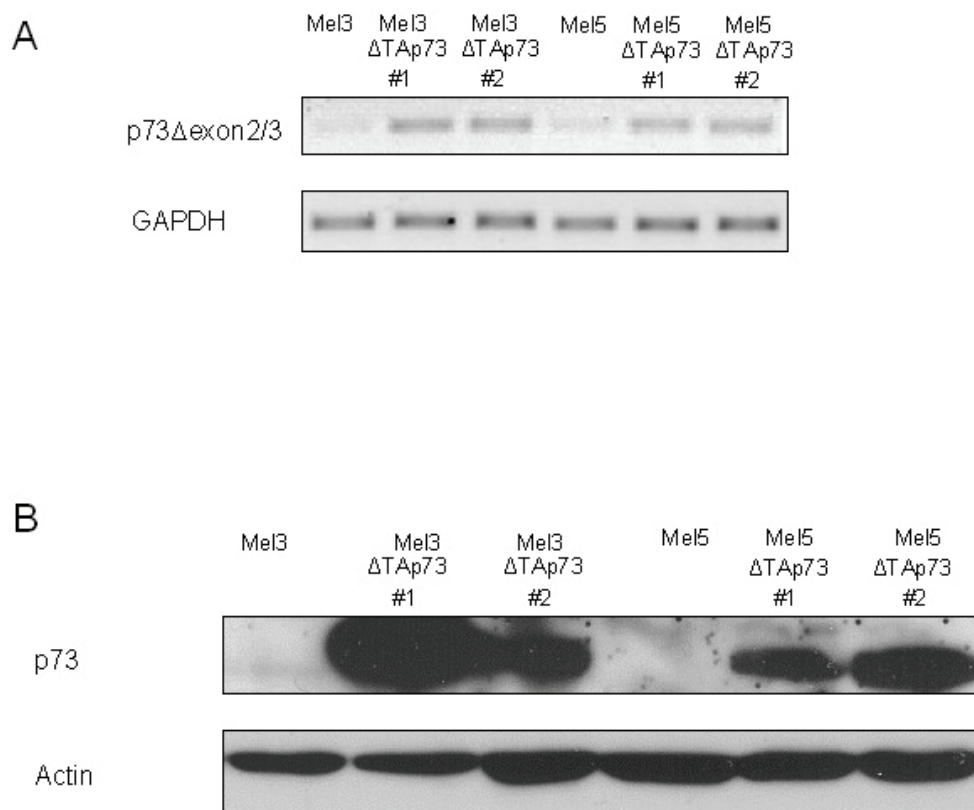


Abb.3.1: Expression des Transgens Δ TAp73 in den stabilen Zelllinien von Mel 3 und Mel 5 A) auf RNA-Ebene durch RT-PCR nachgewiesen und B) als Proteinbanden im Western Blot.

3.2 Funktionelle Charakterisierung der Δ TAp73-exprimierenden Zelllinien *in vitro*

Ausgangspunkt der Experimente war die Hypothese, dass Δ TAp73 das Wachstum von Tumorzellen hinsichtlich Tumorinvasion und Metastasierung beeinflusst. Aus diesem Grunde wurden mehrere Funktionsassays, die Zelleigenschaften wie substratunabhängiges Wachstum, Invasivität, Zellmigration, Zelladhäsion und Resistenz gegen Chemotherapeutika charakterisieren, durchgeführt.

3.2.1 Soft-Agar-Assay

Die Fähigkeit, ohne Kontakt zu einem Substrat und anderen Zellen zu überleben und zu wachsen, wird nur Krebszellen zugeschrieben, d.h. ehemals normalen Körperzellen, die maligne transformiert sind. Dies wird *in vitro* mit dem klassischen Soft-Agar-Assay untersucht. Dieser liefert einen Hinweis auf eine erhöhte Proliferationsrate. Darüber hinaus würde eine erhöhte Fähigkeit zur Koloniebildung im Weichagar auch auf eine allgemein erhöhte Resistenz gegen physiologischen Stress hinweisen, dem die Zellen während des

Prozesses der Metastasierung ausgesetzt sind. Um Aufschluss über das Verhalten der Transfektanten im Softagar zu erhalten, wurden die Zellen vereinzelt in einer Matrix aus mit Agar verdicktem Kulturmedium ausgesät und für drei Wochen im Brutschrank kultiviert. In Abbildung 3.2 sieht man die entstandenen Kolonien jeweils eines Klon von Mel 3 und Mel 5. Als Kolonie wurde jede Zellansammlung, die aus mehr als 3 Zellen bestand, gezählt.

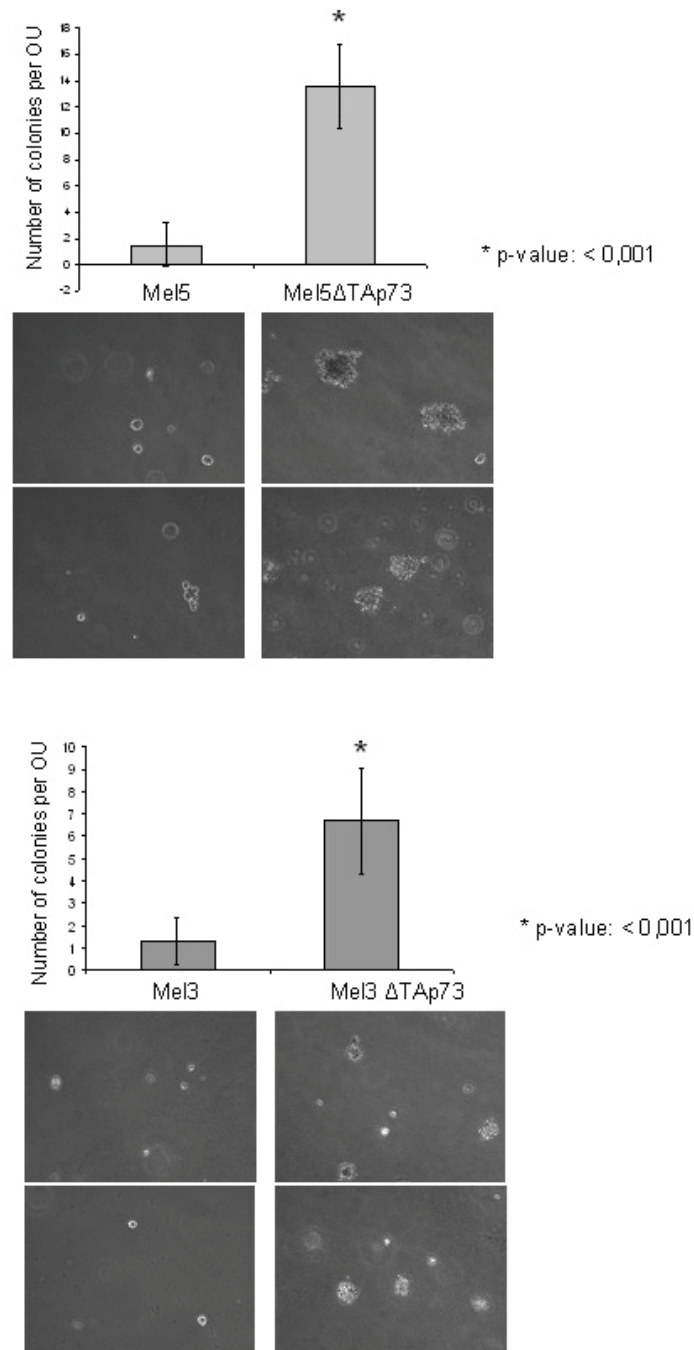


Abb. 3.2: Soft-Agar-Assay. Mel 3 und Mel 5, die stabil Δ TAp73 exprimieren, bilden schneller größere Kolonien in einer halbfesten Agar-Matrix. (OU= optical unit, optische Einheit, entspricht einem Bildausschnitt im Mikroskop)

Der transgene Klon von Mel 5 bildete schon nach 10 Tagen kleine Kolonien aus, bei der Kontroll-Zelllinie mit dem leeren Plasmid hingegen traten nur sehr vereinzelt Kolonien auf. Dies bestätigte sich auch im weiteren Verlauf des Experiments. Die durchschnittliche Koloniegröße nach 14 Tagen betrug bei Mel5- Δ TAp73 9 Zellen pro Kolonie und bei der Kontrollzelllinie 3 Zellen pro Kolonie. Für Mel 3 war die Koloniebildung sowohl bei den Δ TAp73-transfizierten Zellen als auch bei der Kontrolle geringer. Zwar konnte auch hier eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl an Kolonien bei den transgenen Klonen gezeigt werden, jedoch waren diese Kolonien kleiner und weniger zahlreich als bei Mel 5 (durchschnittliche Koloniegröße nach 14 Tagen für Mel3- Δ TAp73 4 Zellen pro Kolonie, für die Kontrolle 3 Zellen pro Kolonie). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine erhöhte Expression der onkogenen p73-Isoform die Fähigkeit der Melanomzellen erhöht, ohne Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakt zu überleben.

3.2.2 Boyden-Chamber-Assay

Wie schon im Methodenteil der Arbeit beschrieben, ist der Boyden-Chamber-Assay ein *in-vitro*-Invasionsassay, der viele Schritte der Invasion relativ realistisch simulieren kann. So müssen die Zellen an die extrazelluläre Matrix (Matrigel) adhären und durch sie und durch die Poren einer Membran migrieren.

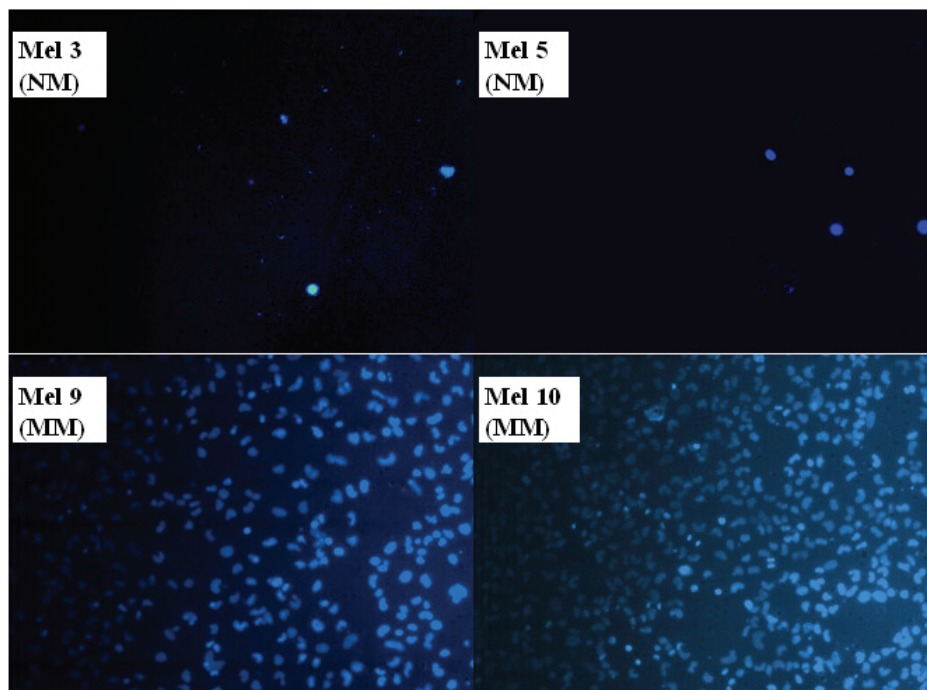


Abb. 3.3: Boyden-Chamber-Assay. Ansicht der Membranen nach Entfernen der Zellen auf der Oberseite und nach Anfärbung der Zellen auf der Unterseite mit DAPI. Mel 3 und Mel 5 sind nicht metastasierend (NM), Mel 9 und Mel 10 sind metastasierend (MM) im experimentellen Mausmodell.

In Abbildung 3.3 sind die Ergebnisse eines Vorexperiments zu sehen. Um zu überprüfen, ob die metastatischen Zelllinien Mel 9 und Mel 10 wirklich invasive Eigenschaften aufweisen, wurden sie mit den nicht metastatischen Zelllinien Mel 3 und Mel 5 hinsichtlich ihres Verhaltens in der Boyden'schen Kammer verglichen. Abbildung 3.3 zeigt die Zellen auf der Unterseite der Membran, d.h. die Zellen, die erfolgreich durch das Matrigel und die Poren der Membran durchgewandert sind. Es wird sehr deutlich, dass die metastasierenden Zelllinien um ein vielfaches invasiver sind als die nicht metastasierenden Zelllinien Mel 3 und Mel 5. Dies zeigt sowohl, dass der Assay aussagekräftig ist, als auch, dass den Zelllinien ihre ursprünglichen Eigenschaften erhalten geblieben sind.

Jetzt konnten die eigentlichen Untersuchungen mit den Δ TAp73-exprimierenden Klonen der ursprünglich nicht metastatischen Zelllinien Mel 3 und Mel 5 erfolgen. Wieder wurden die Experimente mehrmals unabhängig und mit mehreren unterschiedlichen Klonen durchgeführt. In Abbildung 3.4a sieht man die Resultate für Mel 5 und zwei der transgenen Klone. Es scheint, dass durch Langzeit-Expression der verkürzten p73-Isoform die Invasivität der Zellen um das 10-25fache des Ausgangswertes gesteigert wird. Dabei unterscheiden sich die beiden Klone in der Anzahl der durchgewanderten Zellen voneinander. Bei Klon 2 sind doppelt so viele Zellen im Vergleich zu Klon 1 durch die Membran gewandert. Da Klon 1 auch eine geringere Proteinexpression von Δ TAp73 aufweist, könnte dieses Ergebnis auf die unterschiedliche Transgenkonzentration der beiden Klone zurückzuführen sein.

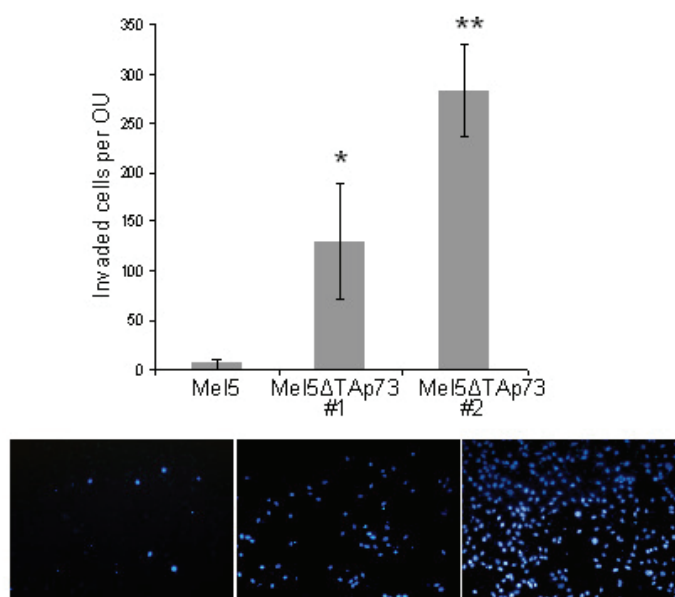


Abb. 3.4a: Boyden-Chamber-Assay mit den stabil Δ TAp73-exprimierenden Zelllinien von Mel 5 (beidseitiger T-Test * p-value < 0,01, ** p-value < 0,05; OU= optical unit, entspricht einem mikroskopischen Sichtfeld)

Es fällt auf, dass die Standardabweichungen in diesem Experiment sehr groß ausfallen. Das ist darauf zurückzuführen, dass fünf Ausschnitte der Membran ausgezählt worden sind. Einer direkt aus der Mitte, und vier in einem bestimmten Umkreis um den Mittelpunkt (siehe Methodenteil 2.2.4.6). In der Mitte der Kammer waren erfahrungsgemäß immer die meisten Zellen durch die Membran migriert. Aus diesem Grund gab es pro Membran fünf Meßwerte, von denen i.d.R. einer sehr groß war (der direkt aus der Mitte der Membran) und vier deutlich kleiner (die aus den äußeren Bereichen der Membran). Dadurch sind die hohen Varianzen der Mittelwerte zu erklären.

Für Mel 3 sind die Ergebnisse des *Boyden-Chamber*-Assays weniger deutlich. Dennoch ist bei den $\Delta TAp73$ -exprimierenden Klonen von Mel 3 ein signifikanter Anstieg in der Zahl der durchgewanderten Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen (Abb. 3.4b). Allerdings ist die Invasivität der Zellen nur um ca. 50% angestiegen, nicht annähernd so stark wie bei Mel 5. Auch sind die Streuungen der Werte hier deutlich größer, was natürlich auch an den relativ niedrigen Werten liegt. Alles in allem bewirkt aber in beiden nicht metastasierenden Zelllinien die dauerhafte Expression von $\Delta TAp73$ ein invasiveres Verhalten der Zellen im Vergleich zu den parentalen Zelllinien und im Fall von Mel 5 sogar eine Potenzierung des invasiven Wachstums.

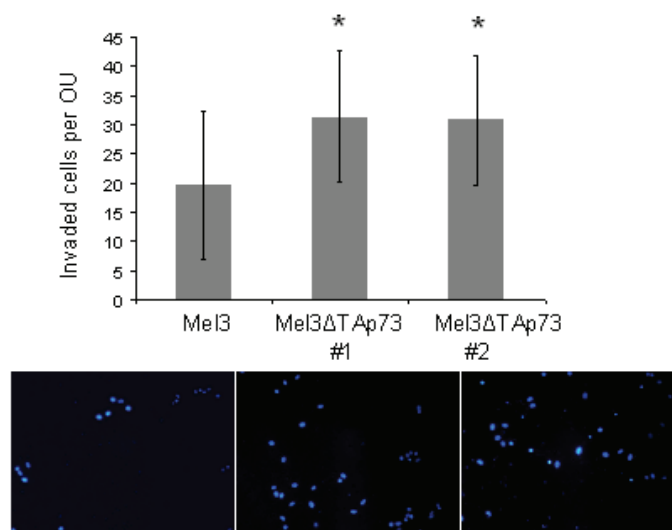


Abb. 3.4b: Boyden-Chamber-Assay mit den stabil p73 Δ Exon2/3 β exprimierenden Zelllinien von Mel 3 (beidseitiger T-Test * p-value < 0,01; OU= optical unit, entspricht einem mikroskopischen Sichtfeld)

3.2.3 Scratch-Assay

Der Scratch-Assay, auch *Wound-Healing-Assay* (Wundheilungs-Assay) genannt, ist eine *in-vitro*-Methode, um die migratorischen Fähigkeiten von Zellen zu untersuchen. In eine Monolayer von Zellen wird eine „Wunde“ gekratzt, sodass ein zellfreier Spalt entsteht. Die angrenzenden Zellen haben dann die Möglichkeit, sich in diesen frei gewordenen Raum zu bewegen. Dies geschieht einerseits durch Zellteilung und andererseits durch aktive Zellbewegung. Byers et al. (80) fanden schon 1991 heraus, dass metastasierende Melanomzellen auch eine höhere Migrationsrate aufweisen als z.B. Melanozyten und Zellen aus primären Melanomen. Aus diesem Grund sollte der Einfluss von N-terminal verkürztem p73 auf diese Eigenschaft der ursprünglich nicht metastatischen Zelllinien Mel 3 und Mel 5 untersucht werden. Abbildung 3.5a zeigt zum einen repräsentative Bilder der Wunden in der Zell-Monolayer, und zum anderen in der Grafik die Distanz zwischen den beiden Zellfronten nach 24 und 48 Stunden bezogen auf den Zeitpunkt 0. Man sieht schon in den Bildern, dass bei Mel 5 der transgene Klon die Lücke in der Zellschicht schon nach 24 Stunden infiltriert hat im Vergleich zu der parentalen Δ TAp73-negativen Zelllinie.

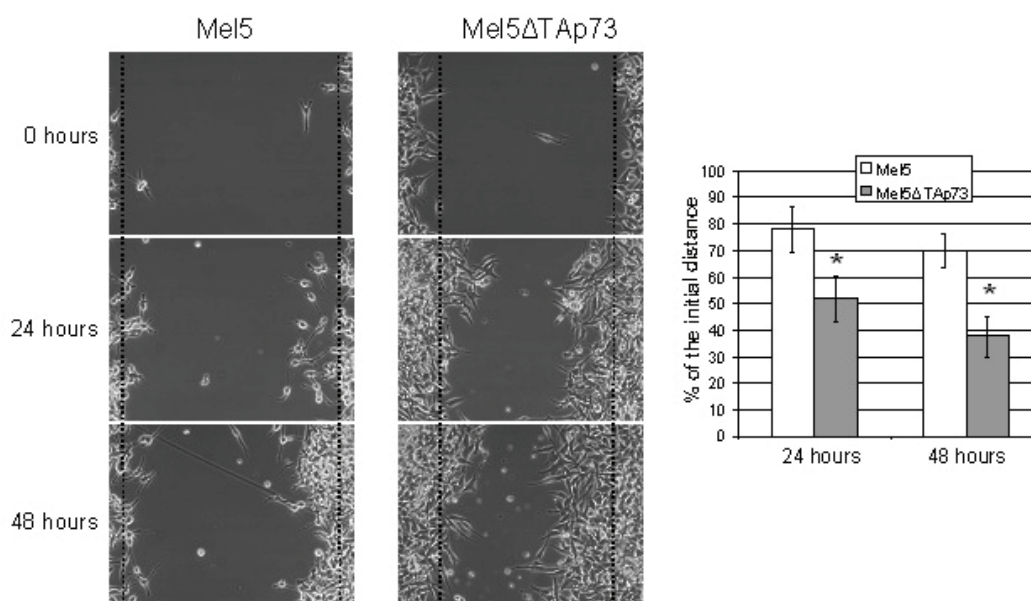


Abb. 3.5a: Scratch-Assay bei Mel 5 und dem transgenen Klon Mel5- Δ TAp73. Die gestrichelten Linien im Bild links zeigt den Abstand der Zellfronten zum Zeitpunkt 0. Rechts zeigt die Grafik die berechneten Abstandsverringerungen zwischen den Zellfronten.

Nach 48 Stunden ist der Spalt zwischen den Zellfronten bei der Δ TAp73-exprimierenden Zelllinie fast geschlossen, im Gegensatz zu der Kontrolle, bei der immer noch zwei deutlich voneinander getrennte Zellfronten bestehen. In Zahlen ausgedrückt, erkennt man die

Unterschiede noch viel deutlicher. Demnach kann man sagen, dass der Abstand zwischen den Zellfronten bei Mel 5 nach 48 Stunden noch 70 % des Ausgangswertes beträgt, bei dem transgenen Klon nur noch ca. 38 %. Die Ergebnisse des Migrations-Assays fallen für Mel 3, wie in allen vorangegangenen Experimenten, etwas schwächer aus als für Mel 5 (siehe Abbildung 3.5b). Die Mel 3-Klone, die stabil $\Delta TAp73$ exprimieren, haben nach 24 Stunden 36% und nach 48 Stunden 42% der Distanz zwischen den Fronten überwunden, die Kontrollzellen nur 17% bzw. 24%.

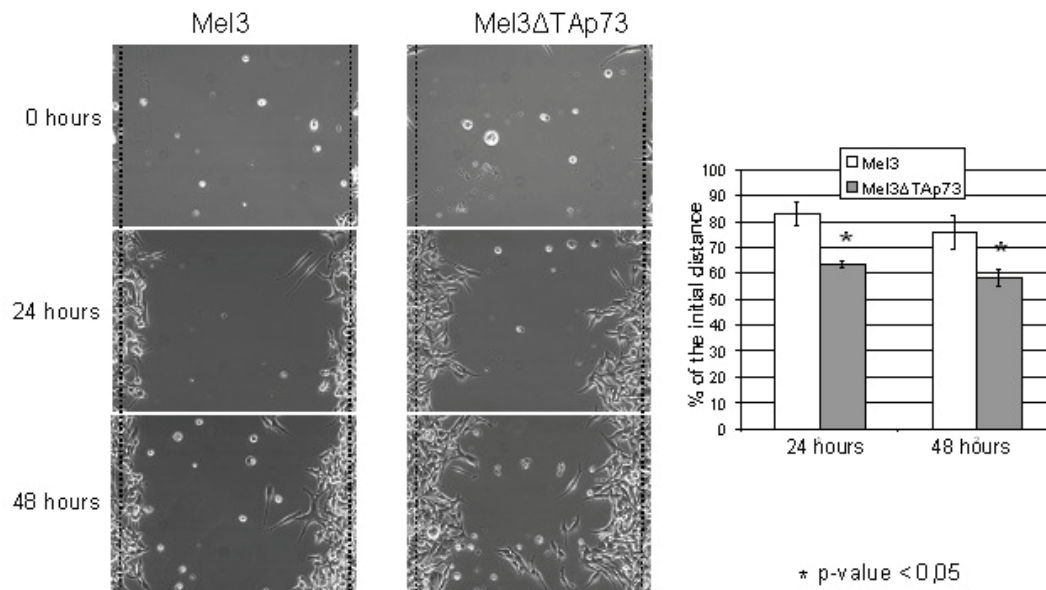


Abb. 3.5b: Scratch-Assay bei Mel 3 und dem transgenen Klon Mel3- $\Delta TAp73$.

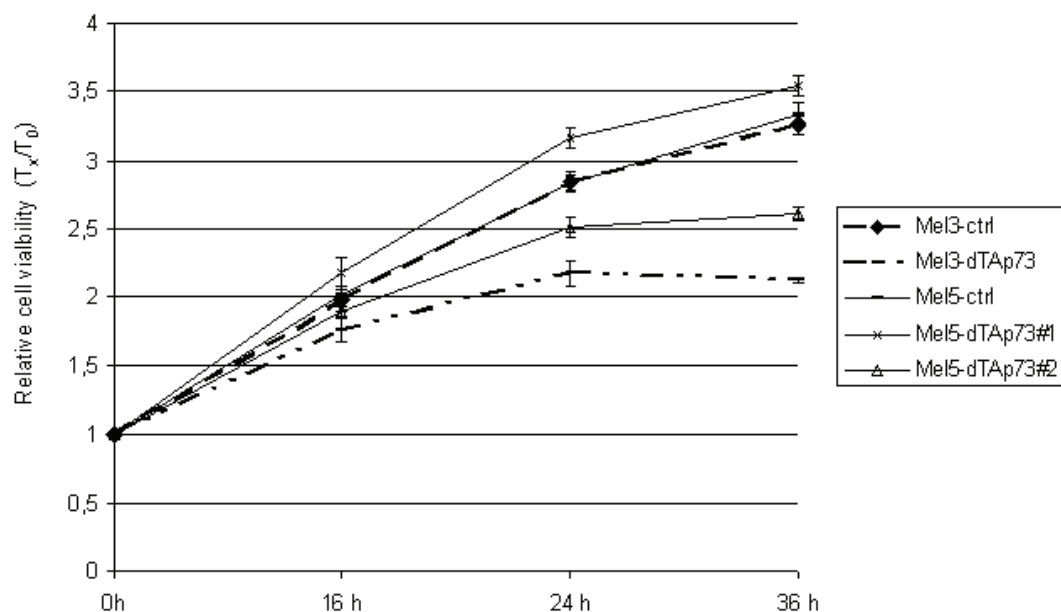


Abb. 3.5c: Bestimmung der Zellvitalität mittels XTT-Assay. Die Absorptionswerte (450 nm) zum Zeitpunkt T_x wurden durch die Werte zum Zeitpunkt T_0 dividiert.

Wenn man diese Resultate allein auf die Migration, d.h. der eigenständigen Wanderung der Zellen, zurückführt, könnte man sagen, dass durch Expression von Δ TAp73 die Migrationsrate von Mel 5 verdoppelt und die von Mel 3 um ca. 30% (beide Werte nach 48 Stunden) gesteigert wird. Betrachtet man die in Abb. 3.5c dargestellte Zellvitalität, die mittels XTT-Assay bestimmt wurde, zeigt sich, dass die Zellvitalität nur für Klon1 von Mel5 höher ist als bei der Kontrolle. Der Δ TAp73-exprimierende Klon von Mel3 und Klon2 von Mel5 sind sogar etwas weniger vital als die entsprechende Kontrolle. Es scheint also, dass die Zellproliferation, die auch die Zellvitalität mitbestimmt, nicht die ausschlaggebende Kraft für die erhöhte Migration ist.

3.2.4 Anoikis-Assay

Das Wort „Anoikis“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet „Obdachlosigkeit“. In der Tumorforschung wurde dieser Begriff erstmalig 1994 von Frisch and Francis (81) eingeführt, um den programmierten Zelltod, der hauptsächlich in epithelialen Zellen durch Auflösung der Zell-Matrix-Adhäsion ausgelöst wird, zu beschreiben. Seitdem wird dieses Phänomen oftmals in Zusammenhang mit Tumorprogression in Richtung Invasion und Metastasierung gebracht. So würde eine Resistenz gegen Anoikis den Zellen einen Wachstumsvorteil verschaffen, und es ihnen ermöglichen, in fremde Milieus (Gewebe) vorzudringen und dort zu überleben.

Um *in vitro* eine Adhäsion der Zellen an das Substrat zu verhindern, werden sie auf Kulturplatten ausgesät, die vorher mit polyHEMA beschichtet wurden. PolyHEMA verhindert, dass sich auf der Oberfläche des Kulturgefäßes extrazelluläre Matrixmoleküle anheften können, die für die Adhäsion der Zellen notwendig sind. Somit adhärieren die Zellen nicht und verbleiben im Medium. Um zu untersuchen, wie sich dieser Stress auf die Zellen auswirkt, wurde die Vitalität der nicht metastasierenden Melanomzelllinie Mel 5 und eines Δ TAp73-exprimierenden Klons unter adhären und nicht-adhären Bedingungen bestimmt. In Abbildung 3.6a sieht man Mel 5-Zellen, die 24 Stunden in normalen und polyHEMA-beschichteten Platten kultiviert wurden. Im Vergleich zur Kontrolle können die Zellen auf der polyHEMA-Oberfläche nicht anhaften und bilden daher sphäroidartige Zellansammlungen.

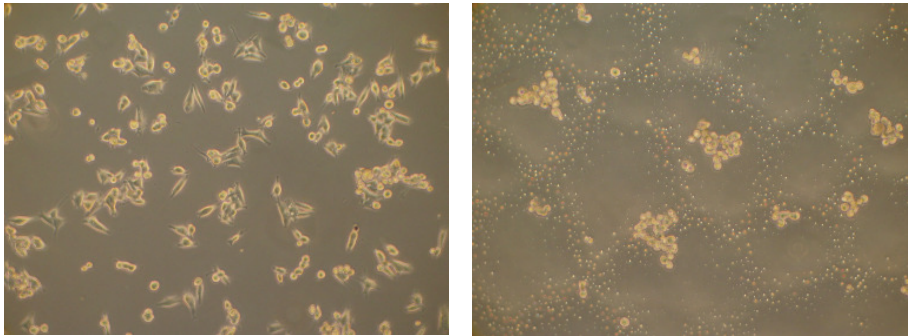


Abb. 3.6a: Mel 5 in normaler Zellkultur (links) und auf polyHEMA-beschichtetem Zellkulturgefäß (rechts).

Wie wirkt sich das aber auf die Lebensfähigkeit der Zellen aus? Dies wurde mittels XTT-Assays analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.6b zusammengefasst. Es wurde die Vitalität der Zellen unter normalen und Anoikis-induzierenden Bedingungen bestimmt. Die beiden Werte wurden ins Verhältnis zueinander gesetzt und das Verhältnis $\text{Vitalität}_{(\text{polyHEMA})} / \text{Vitalität}_{(\text{Kontrolle})}$ in einer Grafik abgebildet. Nach 24 Stunden sind bei Mel 5 80% der Zellen auf polyHEMA im Vergleich zur Kontrolle noch vital, (d.h. dass ohne die Möglichkeit der Adhäsion 20% weniger Zellen überlebt haben als bei der Kontrolle). Bei dem Klon mit stabiler ΔTAp73 -Expression stieg der Wert dann aber auf über 100% an. Das bedeutet, dass eine länger andauernde Expression der verkürzten p73-Isoform die Zellen befähigt, ohne Kontakt zum Substrat zu überleben und sich sogar unter diesen Bedingungen noch zu teilen. Nach 48 Stunden Inkubation auf polyHEMA betrug die Vitalität der nicht modifizierten Mel 5-Zellen noch 70% im Vergleich zur Kontrolle, der transfizierte Klon von Mel 5 aber immer noch nahezu 100%. Nach drei Tagen beträgt die Vitalität der Zellen unter nicht adhärenen Bedingungen 90% der Vitalität unter normalen Wachstumsbedingungen sowohl bei ΔTAp73 -exprimierenden Mel5-Zellen als auch bei den Kontrollzellen. D.h. die Transfektanten sind weniger vital als einen Tag zuvor, aber die Lebensfähigkeit der Kontrollzellen hat sich im Vergleich zum Vortag verbessert.

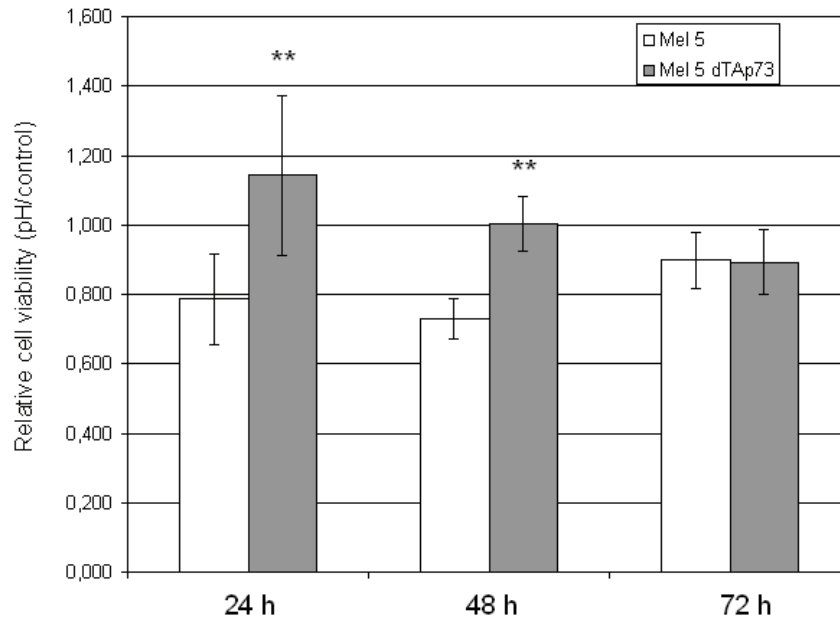


Abb. 3.6b: Anoikis-Assay. Die relative Vitalität der Zellen unter nicht adhärenen Bedingungen wurde mittels XTT-Assay bestimmt. Beidseitiger T-Test: ** P-value $\leq 0,05$

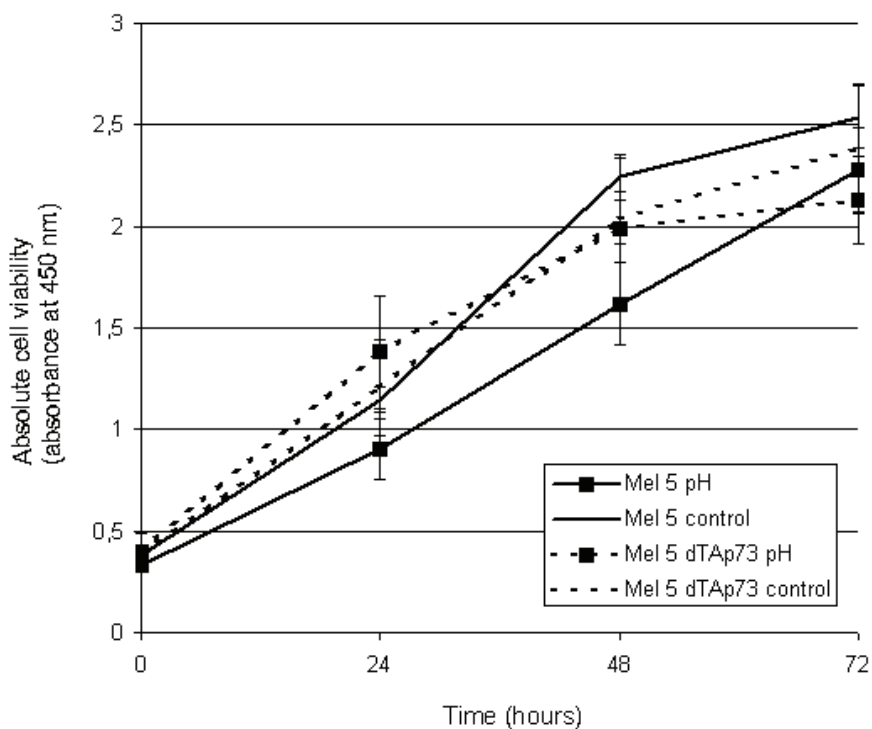


Abb. 3.6c: Anoikis-Assay. Dargestellt ist die absolute Zellvitalität unter adhärenen und nicht adhärenen Bedingungen über die Dauer von 3 Tagen.

Betrachtet man die den Verhältniswerten zu Grunde liegenden Messwerte des Experiments (Abb. 3.6c), erkennt man, dass sowohl Mel 5 als auch der Δ TAp73-exprimierende Klon unter nicht adhärenen Bedingungen in der Lage sind, zu wachsen und sich zu vermehren, wie es

am Anstieg der Absorptionswerte über den Zeitverlauf von 3 Tagen deutlich wird. Man kann daraus schließen, dass die Melanomzelllinie Mel 5 an sich schon eine starke Resistenz gegen Anoikis aufweist. Dennoch kann die Expression einer onkogenen p73-Isoform die Anoikis-Resistenz noch verstärken.

3.2.5 Adhäsionsassay

Während des Prozesses der Tumorprogression müssen sich die Zellen vom Primärtumor separieren, d.h. Zell-Zell-Verbindungen auflösen. Stattdessen müssen die Zellen an die extrazelluläre Matrix und Basalmembranen anheften und durch sie hindurch wandern. Zwei sehr wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix sind Laminin und Fibronectin. Die Fähigkeit, an diese Substrate zu adhären ist essentiell für die Tumorprogression. Diese Eigenschaft wurden im folgenden an den nicht metastasierenden Melanomzelllinien Mel 3 und Mel 5 sowie deren $\Delta TAp73$ -transgenen Klonen untersucht.

Im Vorexperiment mit Mel 5, einem $\Delta TAp73$ -exprimierenden Klon von Mel 5 und der metastasierenden Melanomzelllinie Mel 10 (Abbildung 3.7a), bestätigt sich die Annahme, dass metastasierende Zellen wie Mel 10 sehr viel besser an ECM-Komponenten, hier Laminin, binden als nicht metastasierende Zellen. Auch wird deutlich, dass sich die Expression von $\Delta TAp73$ in der ursprünglich nicht metastatischen Zelllinie Mel 5 positiv auf die Adhäsionseigenschaften auswirkt.

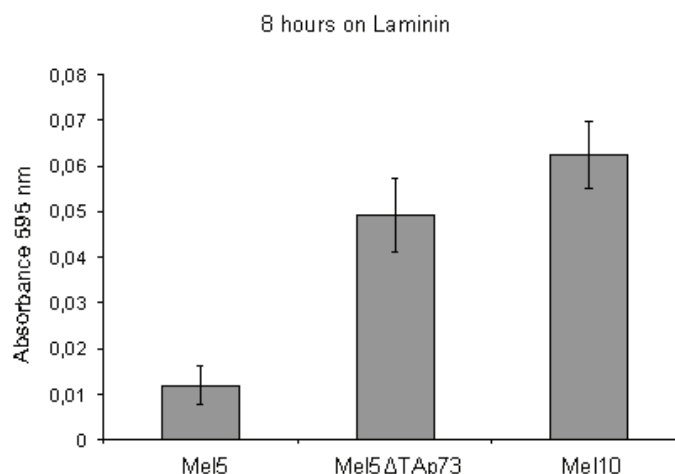


Abb. 3.7a: Adhäsionsassay mit Mel 5, einem transgenen Klon von Mel 5 und der metastasierenden Zelllinie Mel 10. Getestet wurde die Adhäsion an Laminin.

In Abbildung 3.7b sind die Mel 5-Zellen und zwei der $\Delta TAp73$ -exprimierenden Klone nach 6-stündiger Inkubation auf Fibronectin- bzw. Laminin-beschichteten Zellkulturgefäßen zu

sehen. Es fällt auf, dass die parentalen Zellen eine runde Zellmorphologie aufweisen, die darauf schließen lässt, dass die Zellen nicht an den Untergrund angeheftet sind, und sich daher auch nicht flächig ausbreiten können. Die transfizierten Mel 5-Zellen hingegen weisen eine höhere Anzahl an gut ausgebreiteten Zellen auf, wie man schon mit bloßem Auge erkennen kann. Zwar verbleiben auch hier einige Zellen noch im Überstand, aber im Vergleich zur parentalen Zelllinie adhärieren die $\Delta TAp73$ -exprimierenden Zellen sehr viel stärker sowohl an Laminin als auch an Fibronektin.

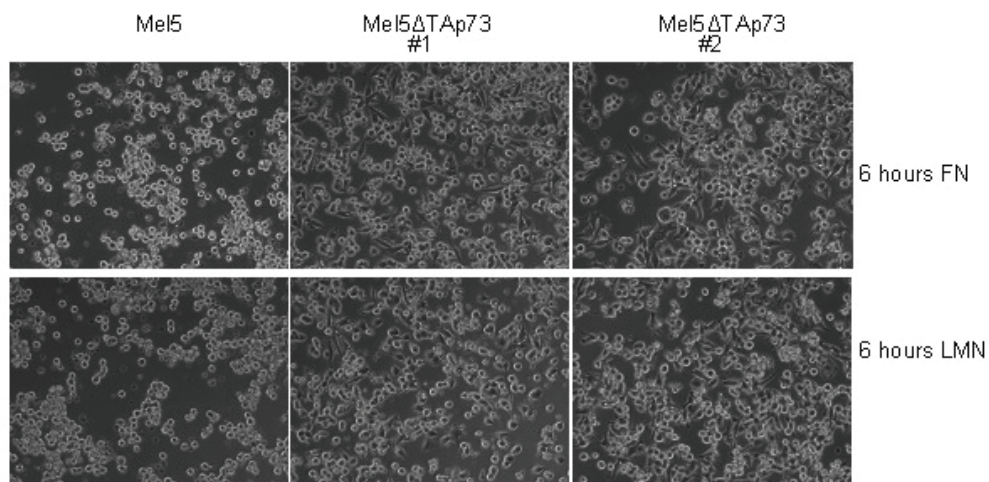


Abb. 3.7b: Mel 5 und zwei $\Delta TAp73$ -exprimierende Klone kultiviert auf Fibronektin-(FN, obere Reihe) und Laminin-(LMN, untere Reihe) beschichteten Platten zur Untersuchung der Adhäsion an diese ECM-Komponenten.

Um diese Beobachtungen besser auswerten zu können, wurde ein in-vitro-Adhäsionsassay durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in beschichteten 96-Well-Mikrotiter-Platten ausgesät und die Anzahl der adhären Zellen nach Färbung im ELISA-Reader bestimmt. Die Ergebnisse dieses Tests für Mel 3 und Mel 5 und jeweils zweier Klone sind in Abbildung 3.7c dargestellt. Für Mel 5 scheint die Expression der onkogenen p73-Isoform die Adhäsionskapazität an Fibronektin zu verdreifachen (Klon 1) bzw. vervierfachen (Klon 2), und das mit einer sehr hohen statistischen Signifikanz. Für die Adhäsion an Laminin ist der Effekt noch gravierender. Die Anzahl der adhären Zellen ist bei Klon 1 fünfmal und bei Klon 2 sogar mehr als sechsmal so groß wie bei der Kontrollzelllinie Mel 5. Der P-Wert des statistischen T-Tests ergibt in allen diesen Fällen einen Wert von $< 0,01$.

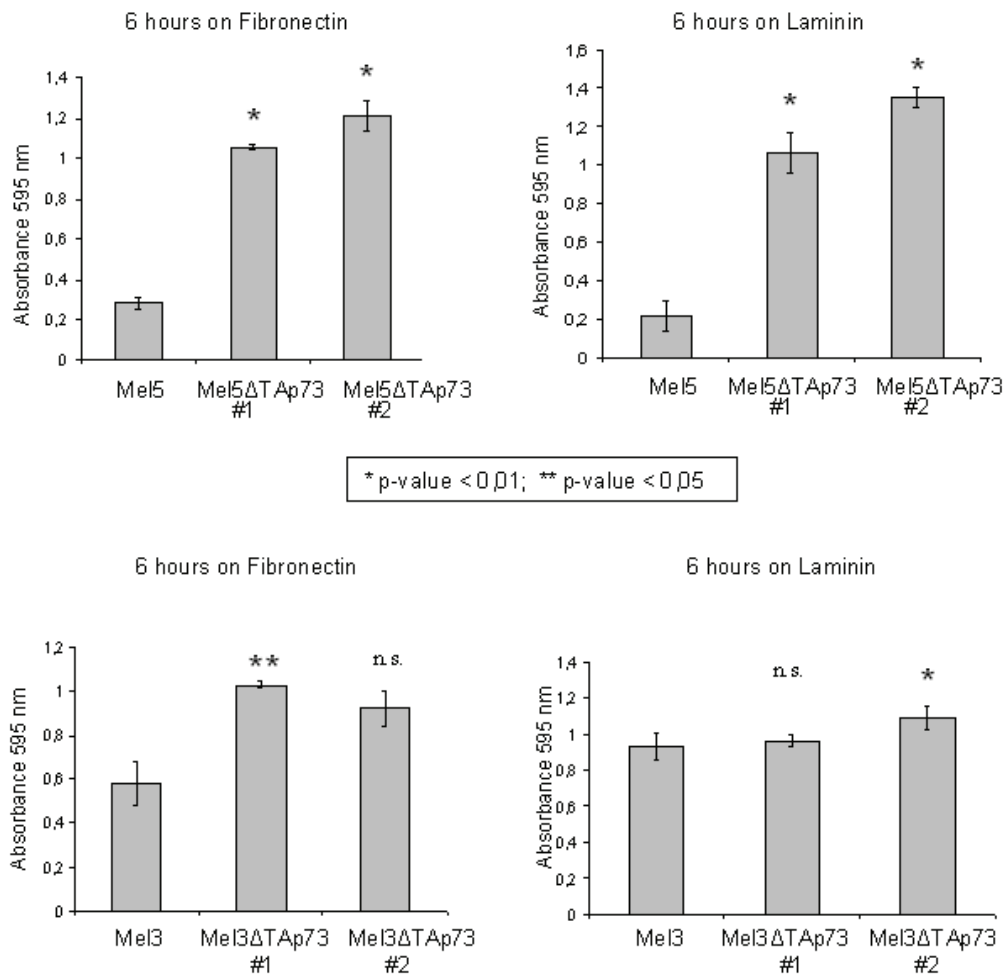


Abb. 3.7c: Adhäsionsassay mit Mel 5 (oben) und Mel 3 (unten) und jeweils zwei Transfektanten.

Auch bei diesem Experiment zeigt sich wieder, dass der Einfluss von Δ TAp73 in der nicht metastatischen Zelllinie Mel 3 bei weitem nicht so stark ist wie bei Mel 5. Für die Adhäsion an Fibronectin kann ein Anstieg um ca. 100% für Klon 1 beobachtet werden. Ein zweiter Klon adhärert auch verstärkt an FN, jedoch nicht mit ausreichender statistischer Signifikanz (P-Wert > 0,05). Für die Interaktion der Zellen mit Laminin konnte für die Klone von Mel 3 kein Unterschied im Adhäsionsverhalten im Vergleich zur parentalen Zelllinie nachgewiesen werden.

3.2.6 Induktion von Apoptose durch Chemotherapeutika

Die wichtigste Therapie des malignen Melanoms ist die operative Entfernung des Primärtumors. Sind zu diesem Zeitpunkt keine Metastasen nachweisbar, ist eine weitere Therapie in den meisten Fällen nicht erforderlich und der Patient gilt als geheilt. Hat der Primärtumor allerdings schon in andere Organe gestreut, bedeutet das für den Patienten eine relativ schlechte Prognose, da das Melanom im allgemeinen schlecht auf Chemotherapie

anspricht. Grund dafür ist wahrscheinlich eine Störung der Apoptose-Signalwege in den Melanomzellen. Dabei ist Apoptose-Resistenz besonders im fortgeschrittenen Stadium der Tumorentwicklung evident (96). Tuve et al. zeigten, dass eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen TAp73 und Δ TAp73 in Richtung TAp73 die Zellen gegenüber Apoptose, ausgelöst durch die Zytostatika Cisplatin und Adriamycin, sensibilisiert (82).

Demzufolge sollte die Überexpression von Δ TAp73 in den Zellen durch Überschuss an onkogenem p73 zur verstärkten Resistenz gegenüber Apoptose-Stimuli (wie Chemotherapeutika) führen. Dies wurde *in vitro* mit den beiden Zytostatika Cisplatin und Adriamycin (auch Doxorubicin) an den Δ TAp73-exprimierenden Mel 3- und Mel 5-Zelllinien untersucht.

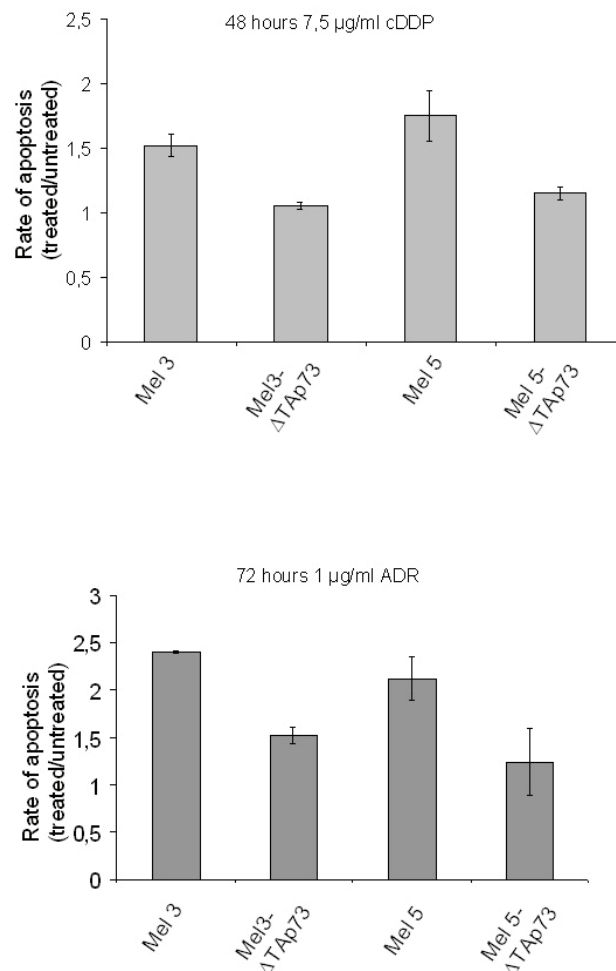


Abb. 3.8: Messung der Apoptose-Rate in Mel 3 und Mel 5 und deren transfizierten Klonen nach *in vitro*-Behandlung mit Cisplatin (cDDP) bzw. Adriamycin (ADR)

Die Resultate der Zytostatika-Behandlung von Mel 3 und Mel 5 und jeweils eines transgenen Klones zeigt Abbildung 3.8. Dargestellt sind die Apoptoseraten, d.h. der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen der behandelten Probe dividiert durch den der unbehandelten Kontrolle.

Die einzusetzenden Konzentrationen der Chemotherapeutika wurden in Vorexperimenten bestimmt. Es wurde die Konzentration ausgewählt, bei der mindestens 20% der Kontrollzellen (d.h. Mel 3 und Mel 5 untransfiziert) apoptotisch waren. Dies ergab für die Behandlung der Zellen mit Cisplatin eine Konzentration von 7,5 µg/ml. Die Apoptoserate der beiden $\Delta TAp73$ -exprimierenden Klone von Mel 3 und Mel 5 liegt bei 1 bzw. 1,2. Das heißt es kommt zu keiner bzw. einer nur sehr geringen Induktion von Apoptose in den Zellen mit Überschuss an onkogenem p73. In den Kontrollzelllinien beträgt die Apoptoserate bei Mel 3 ca. 1,5 und bei Mel 5 ca. 1,7. Das entspricht einer um 50% bzw. 70% erhöhten Apoptoserate im Vergleich zu den transgenen Klonen, bzw. einer erniedrigten Apoptoserate in $\Delta TAp73$ -exprimierenden Zellen im Vergleich zu den unmodifizierten Kontrollzellen.

Für die Reaktion der Zellen auf Adriamycin sind die Ergebnisse ähnlich. Es wurde eine Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Die untransfizierten Zelllinien Mel 3 und Mel 5 haben eine Apoptoserate von 2,4 bzw. 2,1. D.h. die Behandlung mit Adriamycin bewirkt eine Verdopplung der Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die transgenen Klone hingegen bleiben wieder deutlich unter diesen Werten.

Aus den Messwerten der FACS-Analyse ging jedoch hervor, dass der Anteil apoptischer Zellen auch bei Behandlung der parentalen Zelllinien nie 30-40% überstieg. Das weist darauf hin, dass die Zellen, trotz der extrem hohen eingesetzten Zytostatika-Konzentrationen, nicht sehr sensitiv gegen diese Behandlung sind. Die transaktivierungs-defiziente p73-Isoform konnte jedoch die relativ niedrige Ansprechrate der Zellen auf die Zytostatika Cisplatin und Adriamycin noch weiter herabsetzen.

3.3 Einfluss der Überexpression von $\Delta TAp73$ auf die Zellmorphologie und die Organisation des Zytoskeletts

3.3.1 Aktinfärbung

Die Umorganisation des Zytoskeletts, v.a. aber des Aktin-Zytoskeletts ist wichtiger Bestandteil der Zellmotilität. Dass die nicht metastasierenden Melanomzelllinien Mel 3 und Mel 5 durch Langzeitexpression von p73 Δ Exon2/3 eine erhöhte Tendenz zu Motilität und Invasion zeigen, bewiesen schon die vorangegangenen Experimente. Mittels Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts sollte nun geklärt werden, ob sich diese veränderten Eigenschaften der Zellen auch auf zellmorphologischer Ebene widerspiegeln. Dazu wurden die Zellen fixiert und anschließend mit Phalloidin-TRITC angefärbt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.9 zusammengestellt.

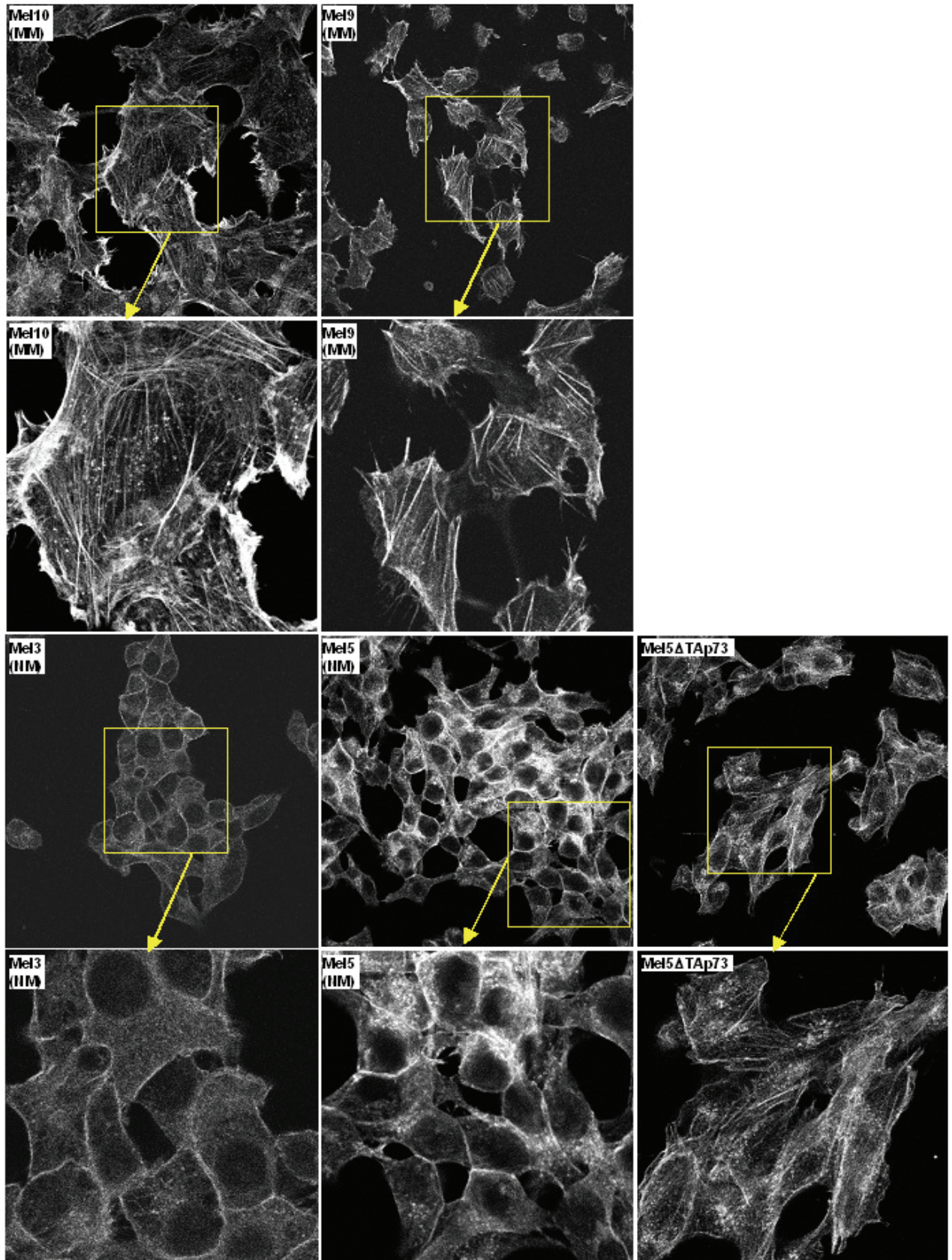


Abb. 3.9: Färbung des Aktin-Zytoskeletts. In den oberen beiden Reihen die metastasierenden (MM) Zellen Mel 9 und Mel 10, in den unteren beiden Reihen die nicht metastasierenden (NM) Mel 3 und Mel 5 und Mel 5- Δ TAp73. Jeweils oben 63x und unten 162x vergrößert.

Bei der Betrachtung des Aktin-Zytoskeletts der metastasierenden Melanomzelllinien Mel 9 und Mel 10 im Vergleich zu den nicht metastasierenden Zelllinien Mel 3 und Mel 5, fällt sofort das Vorhandensein von dicken Fasern bei Mel 9 und Mel 10 auf. Bei Mel 3 und Mel 5 gibt es keine solchen Strukturen. Diese Fasern sind filamentöses Aktin, dass dicht gebündelt in sogenannten Stressfasern organisiert ist. Stressfasern gehen von bestimmten Regionen der Plasmamembran aus, den fokalen Adhäsionen oder Komplexen, innerhalb derer Integrine an extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin und Kollagen binden (83). Diese „Startbereiche“ der Fasern sind auch bei Mel 9 und Mel 10 deutlich erkennbar. Bei Mel 3 und Mel 5 ist das Aktin scheinbar nicht in Fasern organisiert, zumindest sind diese bei der vorliegenden Vergrößerung nicht erkennbar. Das Aktin scheint innerhalb des Zytoplasmas diffus verteilt zu sein und verdichtet sich in der Zellperipherie und an Zell-Zell-Kontakten. Das könnte bedeuten, dass das Aktin vornehmlich als monomere Form, dem sogenannten G-Aktin (globuläres), vorliegt, oder in Mikrofasern, die mikroskopisch nicht nachweisbar sind. Durch Langzeit-Expression von Δ TAp73 in der primär nicht metastasierenden Zelllinie Mel 5, kommt es zur verstärkten Ausbildung faseriger Strukturen in der Zelle. Zwar sind diese Fasern nicht so markant wie die der metastasierenden Zelllinien, aber im Vergleich zur parentalen Zelllinie ist der Unterschied offensichtlich. Dieser Effekt kann mit Herunterregulation der Δ TAp73-Aktivität durch Einsatz einer adenoviralen siRNA gegen p73 umgekehrt werden (siehe Abbildung 3.10).

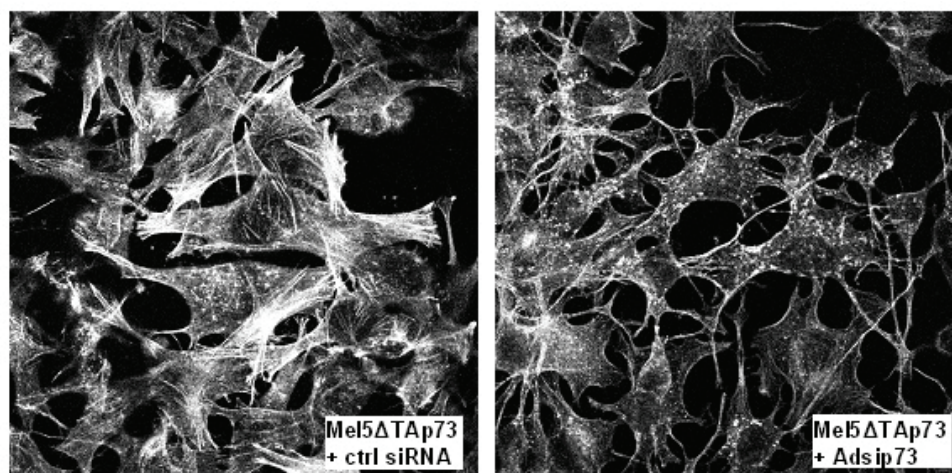


Abb. 3.10: Aktinstruktur von Mel 5- Δ TAp73 nach Behandlung mit siRNA gegen p73 (rechts) und mit Kontroll-siRNA (links)

Die Existenz von Aktinfasern in der Zelle ist Voraussetzung für Zellmotilität und Invasion, denn nur dann ist die Zelle zur Kontraktion und somit zur aktiven Bewegung fähig (4).

Allerdings wird die Rolle von Stressfasern bei der Motilität kontrovers diskutiert. Die Mausmodell-Melanomzelllinie K-1735-LM ist weniger invasiv als K-1735-HM und weist mehr Stressfasern auf. In diesem Modell korreliert eine geringere Anzahl an Stressfasern mit höherem metastatischem Potential der Zellen (84). Byers et al. (80) untersuchten humane Melanomzelllinien und fanden das Gegenteil heraus. Sie konnten Stressfasern hauptsächlich in metastasierenden Melanomen nachweisen. Da das metastatische Potential von Mel 9, Mel 10 und Mel 5-ΔTAp73 experimentell bestätigt wurde, besteht kein Zweifel, dass in diesen Melanomzelllinien eine ausgeprägte Neigung zur Ausbildung von Stressfasern besteht und in den nachgewiesenen nicht metastasierenden Zelllinien nicht.

3.3.2 Immunfärbung von Vimentin und β -Catenin

Vimentin und β -Catenin sind von großer Bedeutung für Zellprozesse während der Metastasierung von Tumorzellen. Vimentin ist als Intermediärfilament-Protein eine wichtige strukturelle Komponente des Zytoskeletts. Eine erhöhte Expression von Vimentin ist assoziiert mit der epithelialen-mesenchymalen-Transition (EMT, 85) von Zellen und damit mit der Aneignung motiler Fähigkeiten.

Um zu überprüfen, ob die Überexpression der transaktivierungs-defizienten p73-Isoform p73ΔExon2/3 β die Vimentinexpression- bzw. Struktur beeinflusst, wurde in dem transfizierten Mel 5-Klon, der parentalen Mel 5-Zelllinie und zum Vergleich in der metastasierenden Zelllinie Mel 10 das zelluläre Vimentin mittels Immunfluoreszenz-Technik angefärbt. Abbildung 3.11 zeigt repräsentative konfokale Mikroskopiebilder der einzelnen Zelllinien. Die grünen Strukturen stellen Vimentin dar, der Zellkern ist rot, da er mit Propidiumiodid gegengefärbt wurde. Es fällt sofort auf, dass die metastasierende Zelllinie Mel 10 einen viel größeren Plasmasaum aufweist als die nicht metastasierenden Mel 5. Die Mel 10-Zellen sind größer und besser auf dem Substrat ausgebreitet als Mel 5. Die Vimentinstruktur tritt dadurch deutlich hervor und zeigt das klassische vom Zellkern bis zur Zellmembran ausgedehnte Intermediärfilament-Netzwerk. Die nicht metastasierenden Mel 5-Zellen sind dagegen kleiner, spindelförmig und haben vergleichsweise weniger Zytoplasma. Dadurch scheint sich das Vimentin an der Zellperipherie, besonders in den Zellausläufern zu verdichten. Ein richtiges Netzwerk, wie bei Mel 10, ist kaum zu erkennen. Auch sind diese Zellen weniger flächig, sondern eher bauchig und damit nicht so gut an das Substrat angeheftet, was durch die Adhäsionsassays bereits bestätigt wurde (siehe Adhäsionsassay 3.2.5.). Der ΔTAp73-exprimierende Mel 5-Klon besitzt eine veränderte Zellmorphologie im

Vergleich zur parentalen Zelllinie Mel 5. Die Zellen sind weniger verzweigt als die Kontrollzellen, haben kürzere Zellausläufer und sind flächiger und damit wahrscheinlich besser mit dem Substrat verbunden (siehe Adhäsionsassay 3.2.5.). Das Vimentin scheint sich netzwerkartig anzuordnen. Morphologisch und von der Struktur des Intermediärfilamentnetzwerkes her, scheinen sich die Mel5- Δ TAp73-Zellen zwischen den metastasierenden Mel 10 und den nicht metastasierenden Mel 5 zu befinden. Dies könnte ein Hinweis für die Beteiligung von transaktivierungsdefizienten p73-Formen an der Entwicklung eines maligneren Phänotyps auf Zellstruktur-Ebene sein.

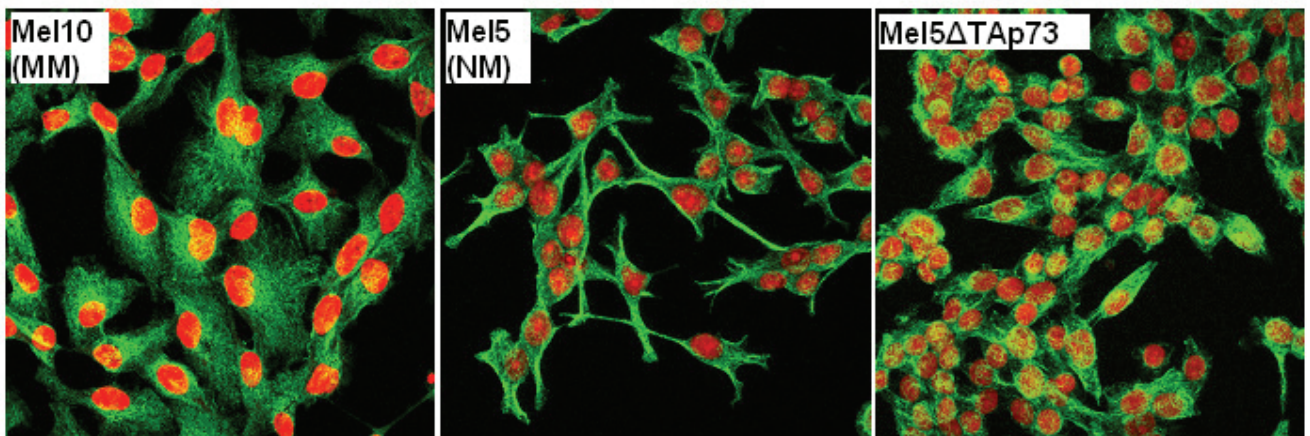


Abb. 3.11: Immunfluoreszenz-Färbung von Vimentin (grün), Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Propidiumiodid.

β -Catenin ist in der Zelle beteiligt an Adhäsion, epithelialer-mesenchymaler-Transition (EMT), Zellmotilität und Invasion (116-118). Entscheidend ist dafür die zelluläre Lokalisation des Proteins. Während der EMT wird β -Catenin aus dem Zytoplasma in den Zellkern transportiert und bewirkt dort die Transaktivierung von Zielgenen.

Um einen Einblick in den β -Catenin-Status der metastasierenden und nicht metastasierenden Zellen und den Einfluss von Δ TAp73 auf diesen zu gewinnen, wurde das zelluläre β -Catenin immunologisch angefärbt. Abbildung 3.12 zeigt die mikroskopisch erstellten Bilder.

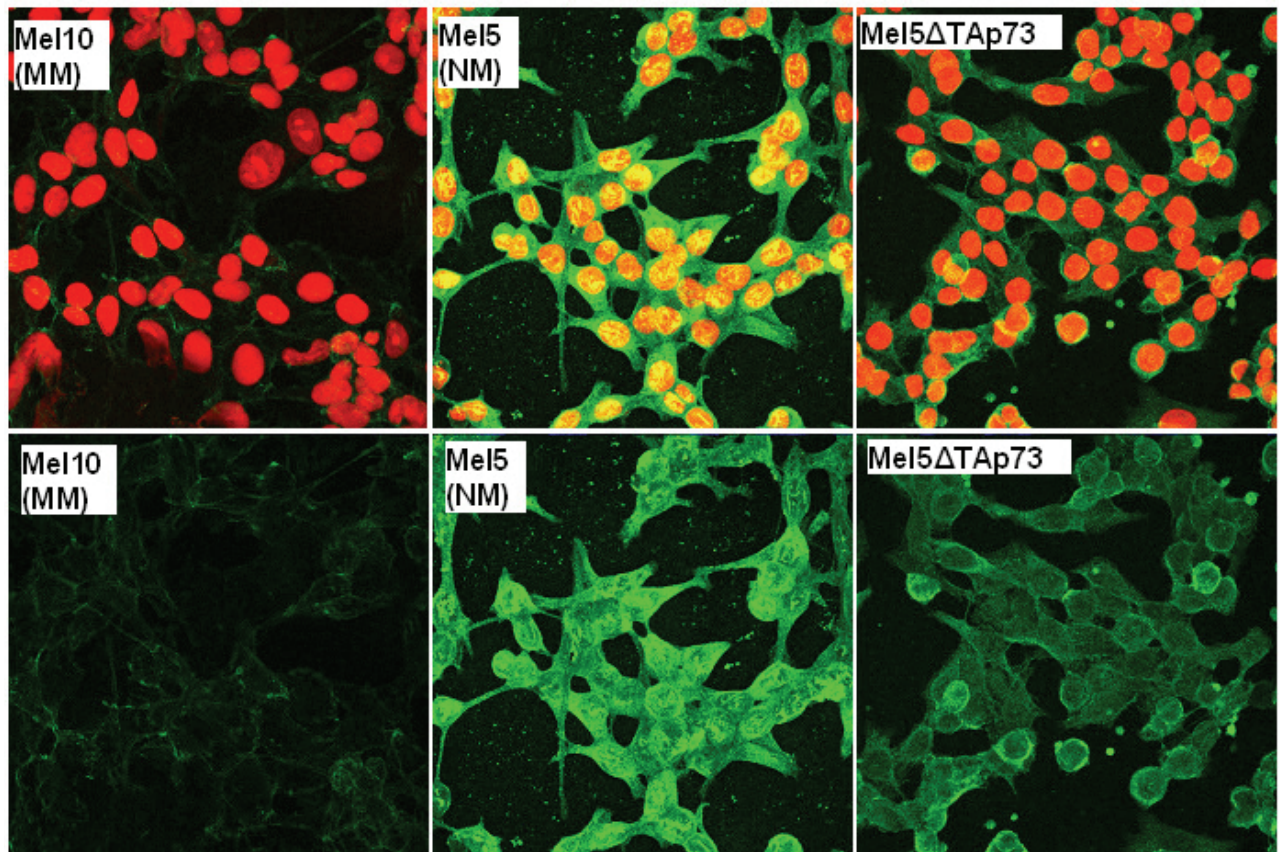


Abb. 3.12: Immunfluoreszenz-Färbung von β -Catenin (grün), Zellkerne (rot) wurden mit Propidiumiodid gegengefärbt. Untere Reihe ohne Zellkernfärbung

Es fällt auf, dass die Färbung in der metastasierenden Zelllinie Mel 10 nur sehr schwach ist. Es sind nur ganz schwache grüne Strukturen im Zytoplasma zu erkennen. Die nicht metastasierenden Mel 5 dagegen zeigen sehr starke β -Catenin-Immunreaktivität sowohl im Plasma als auch im Zellkern. Die Δ TAp73-transfizierten Mel 5-Klone weisen im Vergleich zur parentalen Zelllinie eine niedrigere, aber im Vergleich zu Mel 10 eine höhere β -Catenin-Konzentration auf. Die Lokalisation des Proteins ist hier nicht eindeutig, es scheint hauptsächlich im Zytoplasma aber auch im Zellkern präsent zu sein.

Interessanterweise bietet auch hier die Δ TAp73-exprimierende, primär nicht metastasierende Zelllinie ein intermediäres Bild zwischen der nicht metastasierenden Zelllinie Mel 5 und der metastasierenden Zelllinie Mel 10.

3.4 Einfluss der Überexpression von $\Delta TAp73$ auf das Genexpressionsprofil von nicht metastasierenden Melanom-Zelllinien

3.4.1 GeneChip®-Array Analyse

Um die Auswirkungen einer Langzeitexpression von $\Delta TAp73$ hinsichtlich der Regulation der Genexpression in nicht metastasierenden Zellen zu untersuchen, wurde eine Microarray-Analyse mit der stabil transfizierten $\Delta TAp73$ -exprimierenden Zelllinie Mel 5- $\Delta TAp73$ durchgeführt. Dieses Genexpressionsprofil wurde mit der parallel analysierten parentalen Zelllinie Mel 5 verglichen. Das Ergebnis dieses Vergleichs ist in Abbildung 3.13 als *volcano plot* dargestellt. Dieser zeigt, dass durch die dauerhafte Expression von $\Delta TAp73$ 1356 Probesets mindestens zweifach hoch- oder herunterreguliert werden mit einem p-Wert von 0,05.

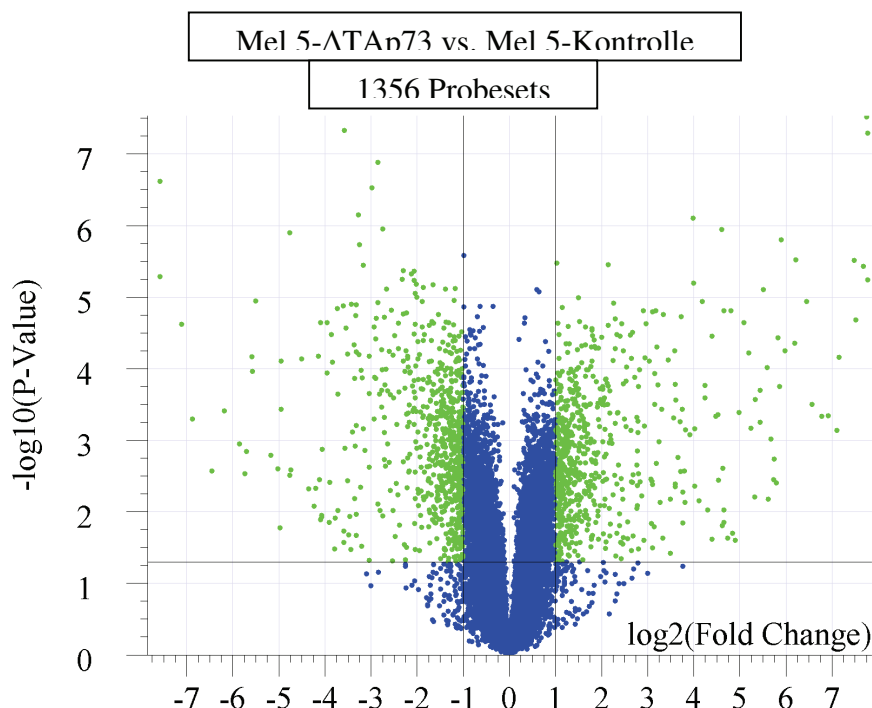


Abb. 3.13: *Volcano plot* zur Darstellung der differentiell exprimierten Gene in der stabilen Zelllinie Mel 5- $\Delta TAp73$ im Vergleich zur parentalen Zelllinie Mel 5. Die Änderung der Genexpression (\log_2) ist gegen den p-Wert ($-\log_{10}$) des T-Tests aufgetragen. Die grünen Punkte kennzeichnen Probesets, die mindestens zweifach verändert sind bei einem p-Wert von $\leq 0,05$.

Die Liste dieser Probesets wurde mit Hilfe des Gene-Ontology-Tools auf der Affymetrix-Webseite (www.affymetrix.com, zum jetzigen Zeitpunkt nicht mehr frei verfügbar) nach ihren

biologischen Funktionen sortiert. Dies ergibt Aufschluss über die Prozesse, an denen ΔTAp73 beteiligt ist. In Abbildung 3.14 sind die 31 wichtigsten Prozesse, auf die ΔTAp73 Einfluss nimmt in einem Tortendiagramm dargestellt.

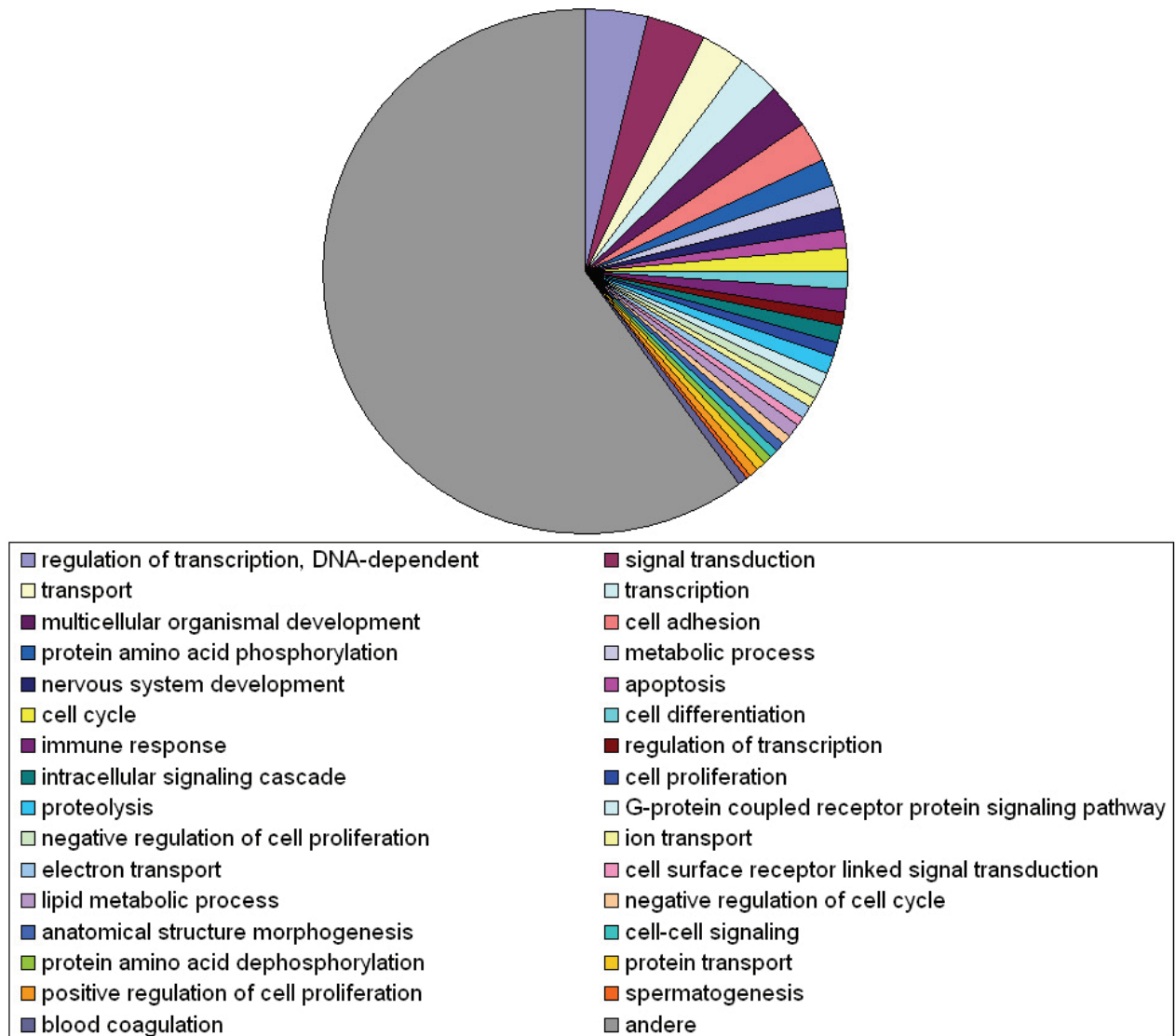


Abb. 3.14: Diagramm über die durch permanente Expression von ΔTAp73 beeinflussten biologischen Prozesse in der nicht metastasierenden Melanomzelllinie Mel 5.

Insgesamt wird eine Vielzahl von biologischen Prozessen durch die Expression von ΔTAp73 reguliert. Vor allem Gene, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind, werden durch ΔTAp73 differentiell exprimiert. Einen starken Einfluss hat ΔTAp73 auch auf Signaltransduktion, Transport, Entwicklung, Zelladhäsion, Stoffwechselprozesse, Entwicklung des Nervensystems, Apoptose, Zellzyklus und Zelldifferenzierung.

Es wird deutlich, dass die Überexpression eines einzelnen Gens, in diesem Fall $\Delta TAp73$, ein komplexes Netzwerk an biologischen Prozessen beeinflusst. Um die Analyse der Genexpression zu effektivieren und spezifischer auf die Beteiligung von p73 und seinen onkogenen Isoformen an der Tumorprogression eingehen zu können, wurde eine zweite Array-Analyse als Referenz durchgeführt (siehe Abb. 3.16). Dazu wurden die Expressionsprofile der bisher in den Experimenten verwendeten metastasierenden Zelllinien Mel 9 und Mel 10 mit denen der nicht metastasierenden Zelllinien Mel 3 und Mel 5 verglichen. Die Zelllinien Mel 9 und Mel 10 bzw. Mel 3 und Mel 5 wurden jeweils einer Gruppe zugeordnet. Die Analyse erfolgte dann zwischen den Gruppen „metastasierend“ versus „nicht metastasierend“. Ergebnis der Auswertung ist eine Liste von 6702 differentiell exprimierten Probesets (siehe Abbildung 3.15). Dabei wurden die gleichen Kriterien wie bei der ersten Analyse angewandt, nämlich zweifache Änderung und ein p-Wert von $\leq 0,05$. Die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene ist in diesem Fall sehr groß. Grund dafür ist, dass nicht nur die Expression von Genen, die an der Ausbildung des metastatischen Phänotyps beteiligt sind, variiert, sondern auch die struktureller Gene, die abhängig vom Patienten sind, aus denen die Zelllinien isoliert wurden.

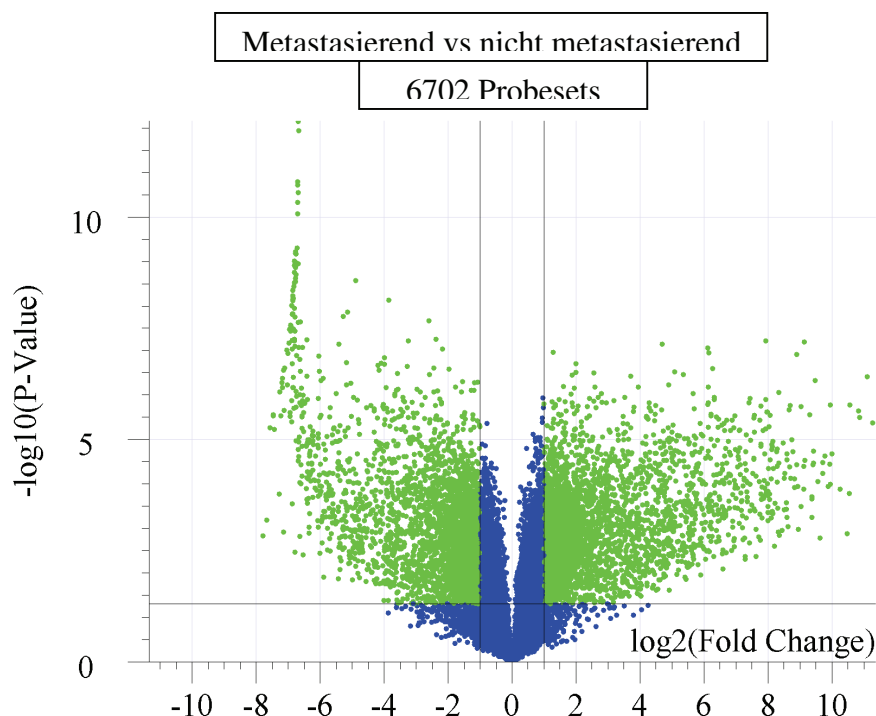


Abb. 3.15: Volcano plot zur Auswertung des Vergleichs metastasierende Zelllinien (Mel 9 und Mel 10) versus nicht metastasierende Zelllinien (Mel 3 und Mel 5).

So erscheinen hier u.a. verantwortliche Gene für die Ausprägung von Geschlechtsmerkmalen, Pigmentierung, Immunsystem und diverse Stoffwechselenzyme. In Abbildung 3.16 ist das

weitere Vorgehen bei der Auswertung schematisch dargestellt. Es wurde zunächst die Schnittmenge der Probesets aus Analyse 1 (Mel 5- Δ TAp73 vs. Mel 5-Kontrolle) und Analyse 2 (metastasierend vs. nicht metastasierend) gebildet, um sich der eben beschriebenen Patienten-spezifischen Gene zu entledigen.

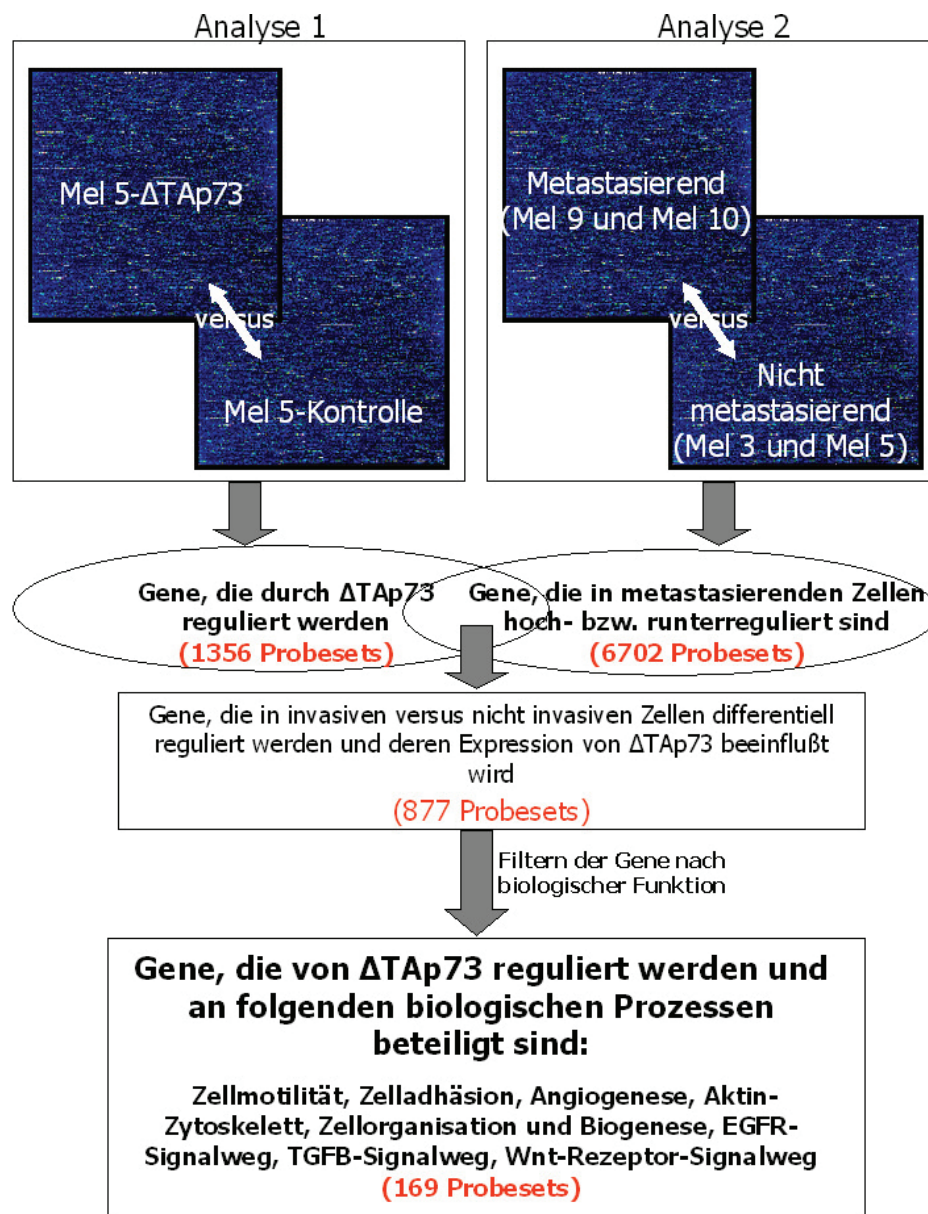


Abb. 3.16: Schema zur Auswertung der Microarrays.

Diese Schnittmenge besteht aus 877 Probesets - eine beeindruckende Zahl, da im Vergleich Mel 5- Δ TAp73 vs. Mel 5-Kontrolle die Gesamtanzahl der differentiell regulierten Gene 1356 beträgt. Das bedeutet, dass weit mehr als die Hälfte (65 %) der von Δ TAp73 regulierten Gene

auch differentiell in den metastasierenden bzw. nicht metastasierenden Melanomzelllinien exprimiert werden.

Um die Resultate noch weiter zu spezifizieren, und die Zahl von 877 Probesets weiter einzugrenzen, wurden diese Gene nach ihrer biologischen Funktion gefiltert. Es wurden nur Gene ausgewählt, die in der Affymetrix-Datenbank unter den folgenden Zellfunktionen annotiert sind: Zellmotilität, Zelladhäsion, Angiogenese, Aktin-Zytoskelett, Zellorganisation und Biogenese, EGFR-Signalweg, TGFB-Signalweg und Wnt-Rezeptor-Signalweg. Dabei muss berücksichtigt werden, dass es in diesem Schritt höchstwahrscheinlich zu einem Datenverlust gekommen ist, da nicht alle Gene hinsichtlich ihrer Funktion in der Affymetrix-Datenbank annotiert sind.

Das Ergebnis dieser komplexen Auswertung sind 169 Probesets, die differentiell exprimiert werden in metastasierenden versus nicht metastasierenden Melanomzellen und wahrscheinlich durch Δ TAp73 reguliert werden und die eine der oben erwähnten Funktionen ausüben. Tabelle 3.1 zeigt einen Auszug aus der Liste dieser 169 Probesets. (Die vollständige Liste kann bei der Leiterin der Abteilung Vektorologie und experimentelle Gentherapie der Universität Rostock, Frau Prof. Dr. Dr. Pützer, eingesehen werden.) Die Gene wurden absteigend nach ihrer Expressionsänderung durch Δ TAp73 sortiert. Demnach werden u.a. folgende Gene in Δ TAp73-exprimierenden Zellen mehr als 100fach höher exprimiert: Galectin 1, ENPP2, GLI3, CCL2 und CSPG2 (= Versican). Mehr als 10fach werden Fascin homolog 1, S100A4, TGFBI, Kollagen Typ XXVII und S100A2 hochreguliert. Unter den Targets, deren mRNA-Level mindestens zweifach erhöht wird, sind Integrin α 6, EDIL3, Thrombospondin 1, Kollagen Typ XVIII, TGFB2, Integrin β 5, CD44, SMURF2 und SMAD3. Die Liste der durch Δ TAp73 herunterregulierten Gene wird angeführt von CHL1, ENTPD1 und ESR2 (estrogen receptor 2). Dann folgen u.a. E-Cadherin (Cadherin 1), Contactin 1, Contactin 3, Formin 2, SEMA6A, CEACAM1, SORBS1 und SERPINF1.

Tabelle 3.1: Auszug aus der Liste der durch Δ TAp73 regulierten Gene, die Tumorprogression- und Invasion regulieren.

Probeset ID	<u>fold</u> <u>change</u> <u>ΔTAp73</u>	<u>fold</u> <u>change</u> <u>metast.</u> <u>vs.</u> <u>nicht</u> <u>metast.</u>	Gensymbol	Gen
	vs K	metast.		
201105_at	109,5	841,5	LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)
209392_at	87,61	52,25	ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)
1569342_at	74,39	32,69	GLI3	GLI-Kruppel family member GLI3 (Greig cephalopolysyndactyly syndrome)
216598_s_at	58,27	347,5	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2
204619_s_at	55,49	296,1	CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)
201564_s_at	40,46	15,63	FSCN1	fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)
203186_s_at	34,19	15,63	S100A4	S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog)
201506_at	17,96	1,495	TGFB1	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
225288_at	15,91	8,38	COL27A1	Collagen, type XXVII, alpha 1
204268_at	15,68	986,8	S100A2	S100 calcium binding protein A2
215177_s_at	9,208	6,22	ITGA6	integrin, alpha 6
204602_at	9,044	29,86	DKK1	dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)
210095_s_at	7,691	6,918	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
225275_at	6,875	191,2	EDIL3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3
201109_s_at	5,233	84,92	THBS1	thrombospondin 1
205201_at	4,343	2,308	GLI3	GLI-Kruppel family member GLI3 (Greig cephalopolysyndactyly syndrome)
209082_s_at	4,168	29,97	COL18A1	collagen, type XVIII, alpha 1
202196_s_at	4,079	29,93	DKK3	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)
228121_at	3,068	6,946	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2
202207_at	2,782	18,5	ARL7	ADP-ribosylation factor-like 7
200636_s_at	2,595	7,62	PTPRF	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F
201124_at	2,471	2,812	ITGB5	integrin, beta 5
202036_s_at	2,458	4	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1
204489_s_at	2,456	4,549	CD44	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)
212099_at	2,447	1,5	RHOB	ras homolog gene family, member B
235629_at	2,346	0,221	FN1	Fibronectin 1
232020_at	2,329	5,187	SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2
205396_at	2,172	4,141	SMAD3	SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila)
201185_at	2,063	4,859	HTRA1	HtrA serine peptidase 1
202283_at	0,49	0,0318	SERPINF1	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1
206576_s_at	0,481	0,0963	CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)
205841_at	0,475	0,314	JAK2	Janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase)
228214_at	0,47	0,082	SOX6	SRY (sex determining region Y)-box 6
218087_s_at	0,465	0,0639	SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1
236379_at	0,462	0,297	EPB41	Erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked)
220454_s_at	0,369	0,0343	SEMA6A	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A
218931_at	0,329	0,00769	RAB17	RAB17, member RAS oncogene family
229831_at	0,222	0,352	CNTN3	contactin 3 (plasmacytoma associated)
227209_at	0,217	0,424	CNTN1	Contactin 1
223618_at	0,19	0,0876	FMN2	formin 2
211118_x_at	0,16	0,0679	ESR2	estrogen receptor 2 (ER beta)
209473_at	0,156	0,0662	ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
201131_s_at	0,154	0,00912	CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
234583_at	0,0882	0,0081	CHL1	Cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)

Die in Tabelle 3.1 aufgeführten Probesets wurden mit Hilfe der Genespring GX7.3.1-Software einer Cluster-Analyse unterzogen, um die Veränderungen des Genexpressionsprofils auch optisch zu veranschaulichen. Geclustert wurden die Arraydaten von Mel 3, Mel 5, Mel 9, Mel 10 und Mel 5- Δ TAp73 jeweils als separate Gruppe. Das Programm stellt für jedes

Probeset (ein Probeset entspricht einer Zeile) den normalisierten Signalwert farblich dar. Gelb bedeutet 1, d.h. *keine Veränderung*, rot bedeutet *erhöhte Signalwerte* und blau *keine bis geringe Signalstärke*. Das Ergebnis der Clusteranalyse wurde als Dendrogramm (Abbildung 3.17) dargestellt. Das Programm berechnet aufgrund des vorliegenden Expressionsprofils der einzelnen Gruppen Mel 9, Mel 10, Mel 3, Mel 5 und Mel 5- Δ TAp73 die Einteilung in übergeordnete Gruppen. Erwartungsgemäß wurden die Arrays der beiden metastasierenden Zelllinien Mel 9 und Mel 10 einer Gruppe zugeordnet. Betrachtet man die farbliche Verteilung, sieht man auch, dass das Expressionsprofil der beiden Zelllinien extrem ähnlich ist. Die beiden nicht metastasierenden Zelllinien Mel 3 und Mel 5 wurden ebenfalls aufgrund ihres ähnlichen Genexpressionsmusters in einer Gruppe zusammengefasst. Das Expressionsprofil der stabilen Zelllinie Mel5- Δ TAp73 - hinsichtlich der hier analysierten Gene - wird durch die Software einer übergeordneten Gruppe von Mel 9 und Mel 10, d.h. den metastasierenden Zellen, zugeteilt. D.h. dass das Genexpressionsprofil der Δ TAp73-exprimierenden Zellen dem der metastasierenden Zellen (Mel 9 und Mel 10) ähnlicher ist als dem der nicht metastasierenden Zellen Mel 3 und Mel 5. Man muss dabei berücksichtigen, dass hier nicht das gesamte Profil betrachtet wurde, sondern nur Gene, die von Bedeutung sind bei der Tumorprogression- und Invasion.

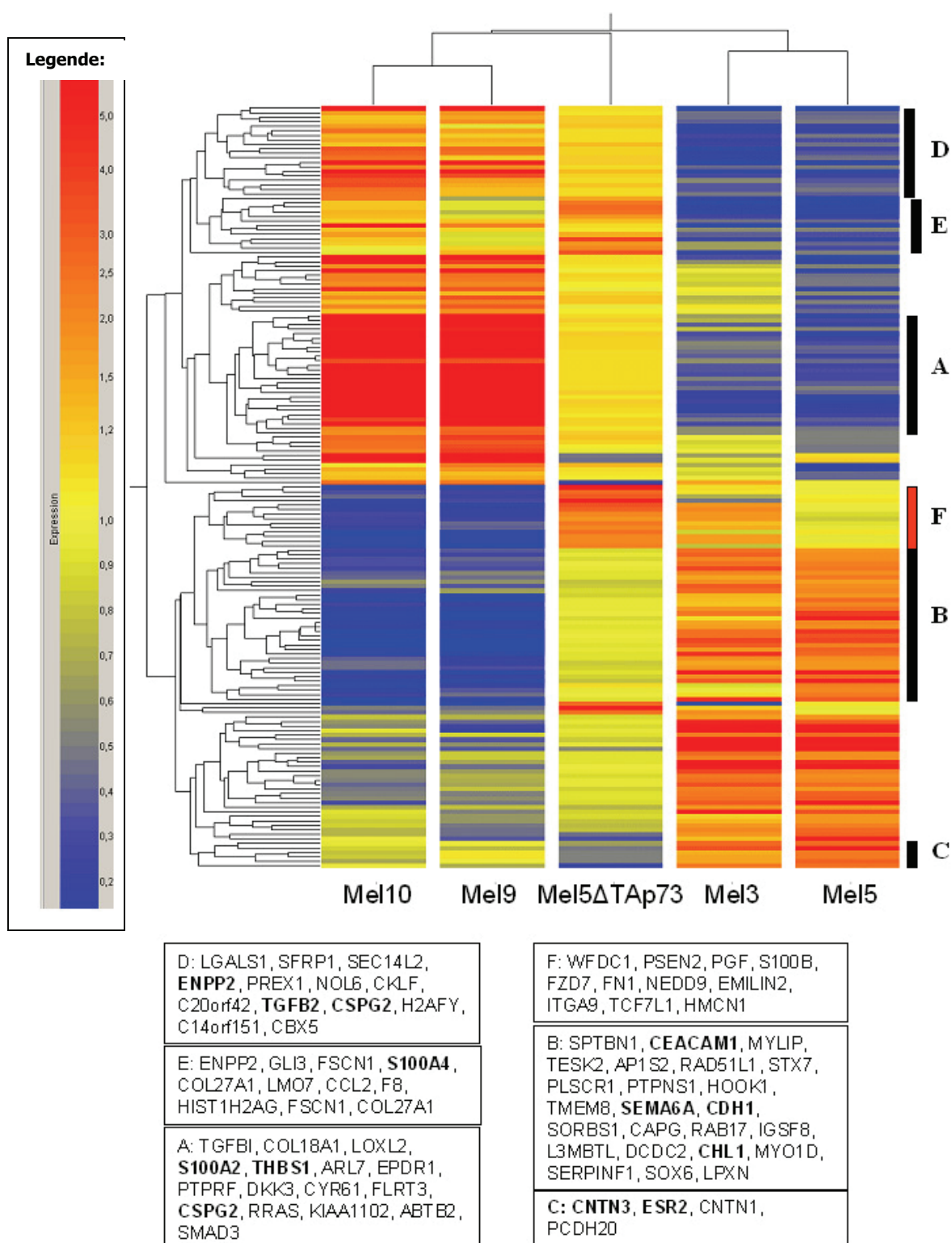


Abb. 3.17. Dendrogramm der Expressionsdaten der in Tabelle 1 aufgeführten metastasierungsrelevanten Probesets für die Micro-Arrays der einzelnen Melanomzelllinien.

Es gibt nur eine ganz kleine Gruppe Probesets (Block F aus Abbildung 3.17), die durch Δ TAp73 hochreguliert wird, aber in den metastasierenden Zellen nur sehr wenig bis gar nicht

exprimiert wird. Betrachtet man die Gene, die bekannt sind für ihre Beteiligung am Prozess der Tumorprogression- und Invasion, ist das Expressionsmuster der Zelllinie Mel 5- Δ TAp73 auf Transkriptomebene dem der metastasierenden Zellen viel ähnlicher als dem der nicht metastasierenden. Diese Ergebnisse bestätigen den mit *in-vitro*-Experimenten gezeigten pro-invasiven Effekt der Langzeitexpression von Δ TAp73 auf mRNA-Ebene der Genexpression.

3.4.2 Validierung der GeneChip®-Ergebnisse mittels semiquantitativer RT-PCR und Western Blot

Für die Validierung der Arraydaten wurden die am stärksten regulierten Gene ausgewählt. Dazu gehören bei den herunterregulierten Genen E-Cadherin (Cadherin 1), MMP8, SEMA6A, CHL1, Estrogen-Receptor 2 (ESR2), DPP4, CCL20, ENTPD1, SPP1, SERPIN F1 und CEACAM1. Zunächst wurde überprüft, ob sich die Verringerung des mRNA-Levels in den nicht metastasierenden Zelllinien Mel 3 und Mel 5 im Vergleich zu den metastasierenden Mel 9 und Mel 10 bzw. in der Zelllinie Mel 5- Δ TAp73 im Vergleich zur parentalen Zelllinie Mel 5 auch auf PCR-Ebene nachweisen lässt. Dies ist in Abbildung 3.18 in den beiden ersten Spalten zu sehen. Die Daten des Arrays lassen sich zu 100% mit semiquantitativer PCR bestätigen. Mel 9 und Mel 10 zeigen für 9 der 11 untersuchten Targets keine nachweisbare Expression. Mel 3 und Mel 5 hingegen schon, wobei auch hier schon deutlich wird, dass sich die mRNA-Level zwischen Mel 3 und Mel 5 z.T. stark unterscheiden. Zum Beispiel sind die Signale für E-Cadherin, MMP8, ESR2 und DPP4 in Mel 5 sehr viel stärker als in Mel 3. Als nächstes sollte getestet werden, ob diese Gene nur durch Langzeitexpression von Δ TAp73, also nur in stabilen Zelllinien, reguliert werden, oder ob durch Transgenexpression über 48 und 72 Stunden auch ein Effekt erzielt wird. Die nicht metastasierenden Zelllinien Mel 3 und Mel 5 wurden dafür mit rekombinanten Adenoviren transduziert, die entweder Δ TAp73 zusammen mit GFP oder als Kontrolle nur GFP exprimieren. Anschließend wurde der mRNA-Level der Targets mit RT-PCR ermittelt (siehe Abbildung 3.18, letzte Spalte).

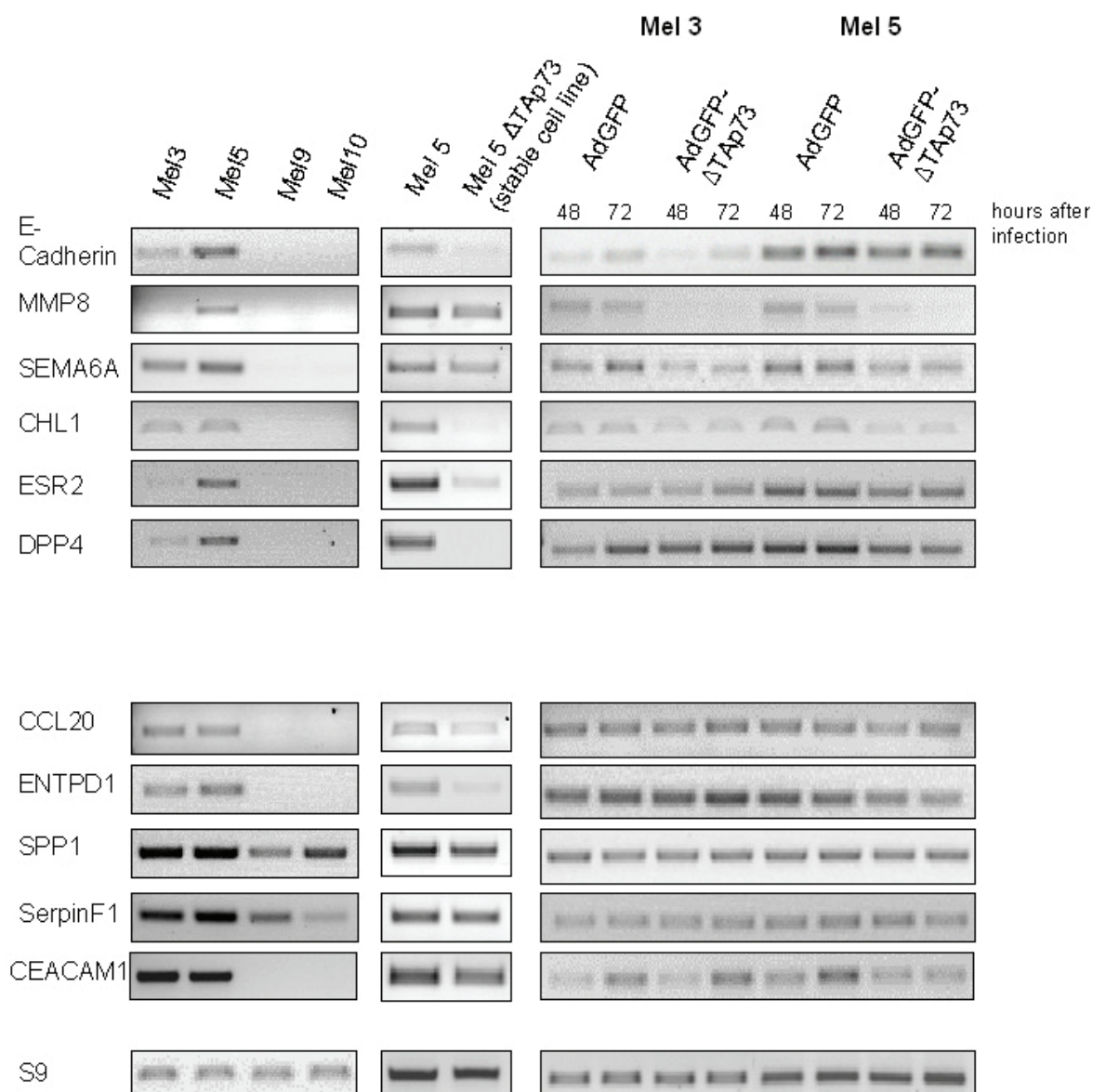


Abb. 3.18. Semiquantitative RT-PCR zur Validierung der Array-Ergebnisse. Die durch Δ TAp73 herunterregulierten Gene.

Für die Gene MMP8, SEMA6A und CHL1 ist eine deutliche Reduktion des Transkriptgehaltes in Mel 3 und Mel 5 durch transiente Expression von Δ TAp73 zu verzeichnen. E-Cadherin zeigt in beiden Zelllinien nur eine schwache Beeinflussung durch Kurzzeitexpression von Δ TAp73. ESR2, DPP4 und ENTPD1 werden nur in Mel 5 herunterreguliert.

Auf dieselbe Weise wurde die Validierung der im Array hochregulierten Gene S100A2, S100A4, CSPG2 (Versican), COL18A1 (Kollagen Typ XVIII), CCL2, Vinculin, Integrin α 6, TGFB2 und ADAM19 durchgeführt. Hier konnten für alle Targets, außer Vinculin, die Daten

der Array-Analyse bestätigt werden (Abb. 3.19). Für S100A4, CSPG2, COL18A1 und CCL2 ist die Hochregulation in der Zelllinie Mel 5- Δ TAp73 verglichen mit Mel 5 sehr stark, da diese Gene vorher so gut wie nicht exprimiert wurden. Auch bei S100A2, TGFB2 und ADAM19 ist der Unterschied zwischen stabiler und parentaler Zelllinie noch sehr deutlich. Nach transienter Expression von Δ TAp73 in den nicht metastasierenden Zelllinien Mel 3 und Mel 5, kommt es nur für S100A2 zu einer starken und für CCL2 zu einer schwachen Hochregulation des mRNA-Levels in beiden Zelllinien. CSPG2 und COL18A1 werden nur in Mel 3 hochreguliert. S100A4 wird in Mel 3 stark erhöht nach Transduktion mit Ad-GFP- Δ TAp73, allerdings zeigt sich bei Mel 5 nach 72 Stunden AdGFP-Exposition eine erhöhte S100A4-Produktion, die bei Mel 3 nicht nachweisbar ist. Diese Tatsache deutet evtl. auf einen Virus-spezifischen Effekt auf die S100A4-Expression hin.

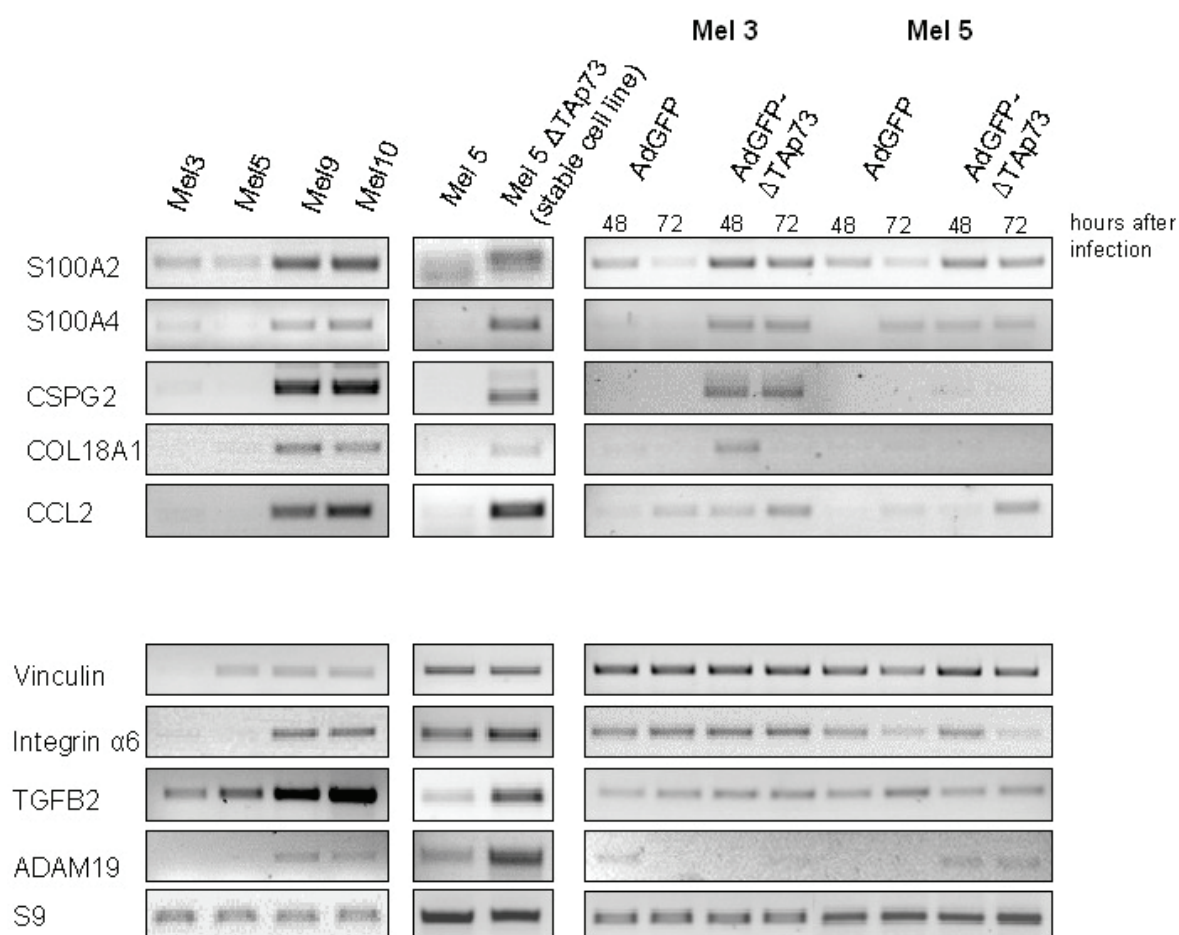


Abb. 3.19. Semiquantitative RT-PCR zur Validierung der Array-Ergebnisse. Die durch Δ TAp73 hochregulierten Gene.

Um zu überprüfen, ob die Hochregulierung der möglichen Zielgene CSPG2, S100A2 und S100A4 direkt oder indirekt durch Δ TAp73 erfolgt, oder ob die Produktion vermittelnder Proteine dafür erforderlich ist, wurden die Zellen nach Infektion mit AdGFP bzw. AdGFP- Δ TAp73 zusätzlich mit Cycloheximid behandelt. Cycloheximid hemmt die de-novo-Proteinsynthese und gibt einen Hinweis darauf, ob die Aktivierung eines Zielgens Endpunkt einer langen Signalkaskade (indirekt) ist, oder ob der Aktivierungsmodus direkt ist. Die Ergebnisse der RT-PCR sind in Abbildung 3.20 zusammengestellt.

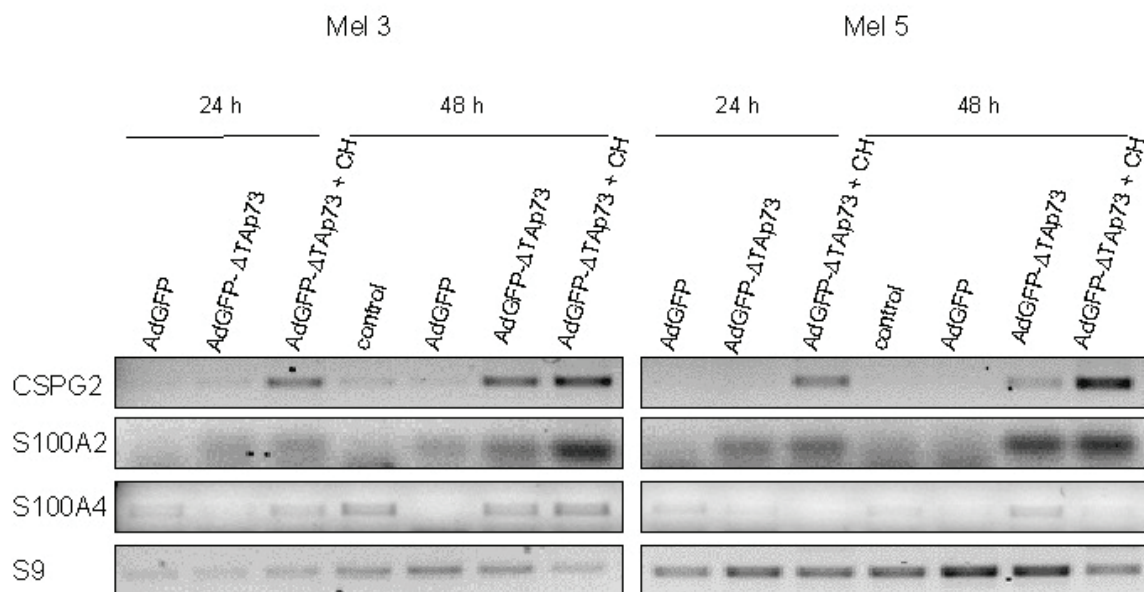


Abb. 3.20. Semiquantitative RT-PCR nach Infektion von Mel 3 und Mel 5 mit AdGFP bzw. AdGFP-p73 Δ Exon2/3 β und gleichzeitiger Behandlung mit Cycloheximid (CH).

CSPG2 (Versican) und S100A2 scheinen direkt durch Δ TAp73 aktiviert zu werden, S100A4 hingegen nicht. Selbstverständlich ist Δ TAp73 ohne N-terminale Transaktivierungsdomäne nicht selbst dazu in der Lage, die Zielpromotoren zu aktivieren, aber möglicherweise liegt die Ursache dieser Aktivierung in der Interaktion des trunkierten p73-Proteins mit anderen Transkriptionsaktivatoren.

Der Verlust der E-Cadherin-Expression ist ein bedeutender Schritt in der Tumorprogression. E-Cadherin vermittelt u.a. Zell-Zellkontakte innerhalb des Tumors und mit benachbarten andersartigen Zellen (z.B. Keratinozyten im Fall von Melanomzellen). Wird E-Cadherin nicht mehr exprimiert, befreien sich die Zellen von der Kontrolle durch die Nachbarzellen und lösen sich vom Primärtumor (95). In der stabil transfizierten Zelllinie Mel 5- Δ TAp73 kam es

zu einer deutlichen Reduktion der E-Cadherin-mRNA. Ob diese Regulation auch auf Proteinebene nachweisbar ist, wurde mittels Western Blot überprüft.

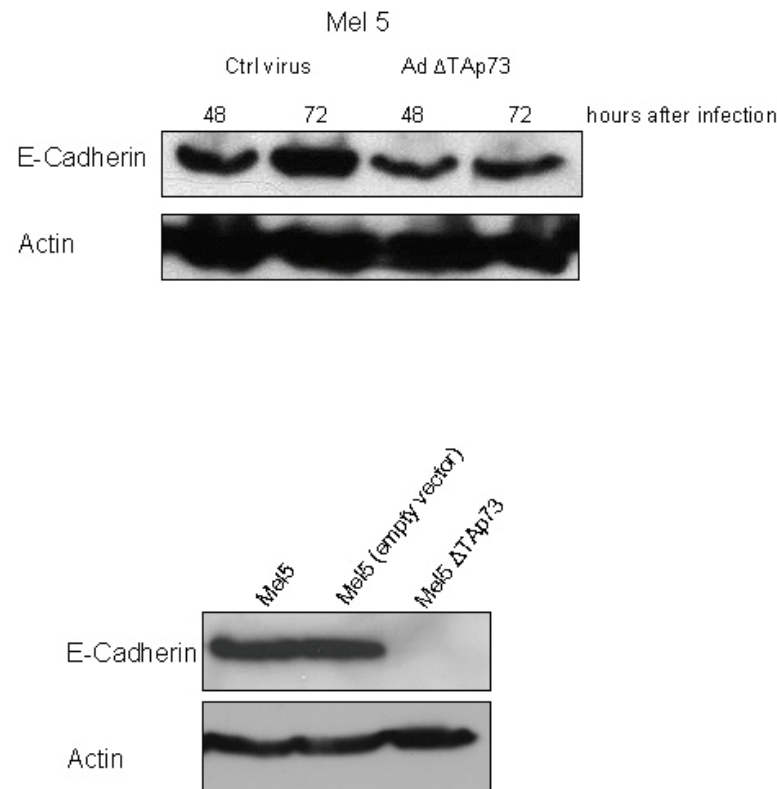


Abb. 3.21. Detektion des E-Cadherin-Proteins durch Western Blot. Oben transiente Expression von p73ΔExon2/3β. Unten Langzeit-Expression in der Zelllinie Mel 5-ΔTAp73

Abbildung 3.21 (oben) zeigt die E-Cadherin-Expression in Mel 5 nach 48 bzw. 72-stündiger Transduktion mit AdGFP-ΔTAp73 bzw. mit dem Kontrollvirus AdGFP. Die Proteinexpression von E-Cadherin wird durch transiente Expression von ΔTAp73 sichtbar reduziert. Abbildung 3.21 (unten) zeigt zum anderen den E-Cadherin-Proteinlevel in der Zelllinie Mel 5-ΔTAp73 im Vergleich zur parentalen Zelllinie Mel 5 und zu der Kontrollzelllinie, die mit dem leeren Expressionsplasmid transfiziert wurde. In diesem Fall ist in Mel 5-ΔTAp73 kein E-Cadherin nachweisbar. Die Proteinlevel der parentalen Zelllinie und der Kontrollzelllinie dagegen sind eindeutig detektierbar. Demnach bewirkt die kurzzeitige ektope Expression von ΔTAp73 in der nicht metastasierenden (E-Cadherin-positiven) Zelllinie Mel 5 eine Verringerung des E-Cadherin-Proteinlevels, eine Langzeitexpression führt in diesem Fall zum vollständigen Verlust des Proteins.

Tabelle 3.2: Liste der durch semiquantitative RT-PCR untersuchten möglichen Zielgene von Δ TAp73

Gensymbol	Genname	Funktion	Regulation durch p73 Δ Exon2/3 β nach Langzeitexpression	Effekt nach transienter Expression von p73 Δ Exon2/3 β
CDH1	E-Cadherin (Cadherin 1)	Zelladhäsionsmolekül	↓	↓
MMP8	Matrix Metalloproteinase 8	Proteolyse	↓	↓
SEMA6A	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A	Angiogenese	↓	↓
CHL1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)	Zelladhäsion, Neuronenmigration	↓	↓
ESR2	Estrogen-Receptor 2	Transkriptionsfaktor	↓	↓ Nur in Mel5
DPP4	Dipeptidyl Peptidase IV	Proteolyse	↓	↓ Nur in Mel5
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	Chemokin	↓	-
ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	Zelladhäsion	↓	↓ Nur in Mel5
SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	Zelladhäsion, extrazellulärer TGF β -Signalweg	↓	-
SERPIN F1	F1serpin peptidase inhibitor, clade F, member 1= Pigment epithelium-derived factor; PEDF	Angiogenese	↓	-
CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	Zelladhäsionsmolekül	↓	-
S100A2	S100 calcium binding protein A2	Endothelzell-Migration	↑	↑
S100A4	S100 calcium binding protein A4	epithelial to mesenchymal transition (EMT)	↑	↑ (aber nicht auswertbar)
CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	Zelladhäsion	↑	↑
COL18A1	Kollagen Typ XVIII		↑	↑ Nur in Mel3
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	Chemotaxis von Monozyten	↑	↑
ITGA6	Integrin α 6	Adhäsionsmolekül	↑	-
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	epithelial to mesenchymal transition (EMT) cell-cell signaling	↑	-
ADAM19	ADAM metalloproteinase domain 19	Proteolyse	↑	↑ Nur in Mel5

Um die Ergebnisse der Transkriptom-Analyse zusammenzufassen, wurden in Tabelle 3.2 die validierten, möglichen Zielgene zusammengestellt.

4 Diskussion

Die extreme Aggressivität des malignen Melanoms ist gekennzeichnet durch sehr frühe Metastasierung und die Resistenz gegenüber konventionellen Therapieformen (124). Die Tatsache, dass die meisten Chemotherapeutika die Tumorzellen durch Induktion von Apoptose töten, lässt vermuten, dass in Melanomzellen apoptotische Signalwege gestört sind. Tatsächlich weisen Melanome eine starke Resistenz gegen Apoptose-auslösende Substanzen auf, vor allem in späten Tumorstadien (96, 125). Ein Hauptvermittler der Apoptose nach Einwirkung DNA-schädigender Agenzien, wie Chemotherapeutika oder Bestrahlung, ist das Tumorsuppressorprotein p53. In vielen Tumoren ist p53 durch Mutationen inaktiviert und beeinflusst somit die Chemoresistenz, aber in Melanomen treten trotz extremer Chemoresistenz selten p53-Mutationen auf (126). Es stellte sich heraus, dass in vielen humanen Tumoren ein anderes Mitglied der p53-Tumorsuppressor-Familie, nämlich p73, verstärkt exprimiert wird (63). Die Entdeckung transaktivierungsdefizienter, onkogener Isoformen ($\Delta Np73$ oder $\Delta TAp73$) dieses Tumorsuppressorproteins, welche Wildtyp-p53- und p73 inhibieren können, bot eine mögliche Erklärung für die Apoptose-Resistenz von Melanomen trotz der Anwesenheit funktionellen p53-Proteins.

Neben der Funktion der N-terminal verkürzten p73-Varianten bei der Chemosensitivität von Tumorzellen konnte auch eine Beteiligung bei der Tumorentstehung bzw. malignen Transformation nachgewiesen werden. So konnten NIH3T3-Fibroblasten durch ektope Expression von Δ exon2/3-p73 erfolgreich transformiert werden und bildeten Tumoren nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse (66). Auch konnten primäre embryonale Fibroblasten der Maus durch Überexpression von $\Delta Np73$ immortalisiert werden und deren Proliferation und Koloniebildung im Softagar gesteigert werden (99). Transgene Mäuse mit leberspezifischer Expression von Δ exon2/3-p73 zeigten erhöhte Proliferation der Hepatozyten und Ausbildung von Leberzelladenomen- und Karzinomen (100).

Zusätzlich zur Rolle der p73-Isoformen bei der Initiation der Tumorigenese, gibt es auch Erkenntnisse über ΔN -p73 als prognostischen Parameter und als Marker für das pathologische Tumorstadium in verschiedenen Tumorarten. So korreliert die $\Delta Np73$ -Expression in Prostata-Karzinomen mit dem Gleason Score (127), in Cervix-Karzinomen mit dem Rezidiv-Risiko (128) sowie bei Kolon- und Brustkrebs mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen und vaskulärer Invasion (78). Für das hepatozelluläre Karzinom gilt ein erhöhter $\Delta Np73$ -Proteinlevel auch als Indikator für schlechtere Überlebenschancen des Patienten (129).

Für das humane maligne Melanom gibt es auch Hinweise für eine Beteiligung der onkogenen p73-Isoformen an der Melanomprogression. In Zelllinien, die aus humanen Melanommetastasen generiert wurden, konnte eine deregulierte Expression von p73-Varianten festgestellt werden (82). Zhang et al. wiesen in Melanomzelllinien aus Metastasen erhöhte p73-Transkript-Level im Vergleich zu Zelllinien aus Primärtumoren nach (77). Tuve et al. entdeckten bei der Untersuchung von gutartigen Muttermalen, primären Melanomen und Melanommetastasen von Patienten eine deutliche Hochregulation von p73-Isoformen in den Metastasen verglichen mit den Primärläsionen (69). Diese Daten veranlassten zu der Vermutung, dass transaktivierungsdefiziente Isoformen von p73 eine bedeutende Funktion bei der Progression von Tumoren, speziell des Melanoms, ausüben könnten und zwar zusätzlich zu dem dominant-negativen Effekt gegenüber p53 bzw. p73 bei der Induktion von Apoptose.

4.1 Ausbildung eines invasiveren Phänotyps bei Melanomzelllinien durch $\Delta TAp73$

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass die Expression von $\Delta TAp73$ (genauer p73 Δ exon2/3 β) in nicht metastasierenden Melanomzellen zur Ausbildung eines invasiveren Phänotyps führt. Dies wurde in verschiedenen *in-vitro*-Assays untersucht. So zeigten die stabil mit $\Delta TAp73$ transfizierten, ursprünglich nicht metastasierenden Zellen eine deutlich erhöhte Koloniebildung im Softagar im Vergleich zu den Kontrollzelllinien. Das kann begründet sein durch eine Erhöhung der Proliferationsrate und/oder einer verstärkten Resistenz gegenüber Zelltod durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten. Eine ähnliche Eigenschaft, nämlich die Resistenz gegenüber Zelltod ausgelöst durch Unterbrechung der Zell-Substrat- und Zell-Zell-Kontakte (Anoikis), wurde ebenfalls untersucht. Anoikis stellt einen Schutzmechanismus des Organismus dar, um das Wachstum von epithelialen und endothelialen Zellen an fremden bzw. unpassenden Organumgebungen zu verhindern. Es existiert die Meinung, dass die Aneignung einer Resistenz gegen Anoikis ein Schlüsselereignis in der Tumorprogression von epithelialen Tumoren in Richtung Invasion und Metastasierung ist (130). In dieser Arbeit konnte durch die Expression von $\Delta TAp73$ die Vitalität von Melanomzellen unter nicht adhärenenten Bedingungen erhöht werden. Da die Transfektanten auch in anderen Tests einen invasiveren Phänotyp aufwiesen als die parentalen Kontrollzelllinien, spricht dieses Ergebnis dafür, dass $\Delta TAp73$ eine bedeutende Rolle bei der Progression von Melanomen, u. a. durch Erhöhung der Anoikis-Resistenz, spielt. Auch Zhu et

al. assoziierten die Resistenz gegen Anoikis mit einem höherem metastatischen Potential von Melanomzellen (131).

Des Weiteren wurde die Invasivität der Δ TAp73-exprimierenden Zelllinien im *Boyden-chamber*-Assay getestet. Hier zeigte sich, dass das invasive Verhalten der Zellen durch Expression von Δ TAp73 drastisch verändert wurde. Für eine der beiden untersuchten Zelllinien (Mel 5- Δ TAp73) konnte die Invasivität um das 10 bis 25fache gesteigert werden. Gründe für invasiveres Verhalten in der Boyden'schen Kammer können eine effizientere Adhäsion der Zellen an das Matrigel, eine stärkere proteolytische Aktivität und eine erhöhte Zellmotilität sein. Dies wurde in weiteren Versuchen analysiert. Matrigel simuliert in der *Boyden chamber* die extrazelluläre Matrix (ECM) und besteht aus ECM-Proteinen wie Laminin und Kollagenen. Für Melanome kommt *in vivo* noch eine wichtige ECM-Komponente, Fibronectin, hinzu. Im *in-vitro*-Adhäsionsassay adhärten die mit Δ TAp73 transfizierten Melanomzelllinien stärker an Laminin und Fibronectin als die Kontrollzelllinien. Eine gute Adhäsionsfähigkeit an Komponenten der ECM ist Voraussetzung für eine effektive Migration und Invasion durch die extrazelluläre Matrix. Auch andere Arbeitsgruppen fanden eine Korrelation zwischen höherer Invasivität von Melanomzellen und stärkerer Adhäsion dieser Zellen an Laminin und Fibronectin (132-134). Um das Migrationspotential der Δ TAp73-exprimierenden Zelllinien zu untersuchen, wurde ein Scratch-Assay durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Zellen mit hohem Δ TAp73-Proteinlevel sehr viel schneller in einen zellfreien Raum wandern können als die Δ TAp73-negativen Zellen. Resultierend aus den Funktionsassays kann die Vermutung, Δ TAp73 sei an der Ausbildung eines progressiveren, invasiveren Phänotyps von Melanomzellen beteiligt, bestätigt werden. Die Invasivität der Zellen, das substratunabhängige Wachstum, das migratorische Potential und das Adhäsionsverhalten der Zellen wurde durch die Überexpression von Δ TAp73 deutlich gesteigert. Zusätzlich zeigten die Zellen auch eine erhöhte Resistenz gegen Apoptose ausgelöst durch die chemotherapeutischen Wirkstoffe Cisplatin und Adriamycin, was auch einen Indikator für Tumorprogression darstellt.

4.2 Auswirkungen ektopter Expression von Δ TAp73 auf das Zytoskelett

Zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Zellmotilität und Invasion stehen in engem Zusammenhang mit dem Aktin-Zytoskelett. Das Aktin-Zytoskelett ist eine hoch dynamische Struktur, die in einer lebenden Zelle durch ein kontrolliertes Gleichgewicht zwischen lokalem Auf- und

Abbau von Aktinfilamenten reguliert wird. Tumorzellen deren Invasionspotential sich verändert hat, sollten demnach auch Veränderungen des Zytoskeletts aufweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte in stark invasiven Melanomzelllinien das Auftreten markanter Aktin-Stressfasern beobachtet werden im Gegensatz zu nicht invasiven Melanomzelllinien, die keine derartigen Strukturen aufwiesen. Durch die ektope Expression von Δ TAp73 wurde die Ausbildung zarter Aktinfasern in ursprünglich nicht invasiven Zellen bewirkt. Die Ausbildung von Aktin-Stressfasern kann durch die vorliegenden Ergebnisse mit dem invasiven Potential von Melanomzelllinien assoziiert werden. Die Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Stressfasern und dem metastatischem Potential von Melanomzellen wurde auch schon von Byers et al. (80) bestätigt. Die Bildung von Stressfasern wird induziert von RhoA (137), einem Mitglied der Familie der Rho-GTPasen. Zu dieser gehören u.a. auch Rac1 und Cdc42, die Signale von Chemokin-, Wachstumsfaktor- und Adhäsionsrezeptoren an die Effektorproteine des Aktinfilamentstoffwechsels weiterleiten und somit Zellmotilität, Adhäsion und EMT (epitheliale-mesenchymale Transition) kontrollieren (138). Rho-Proteine sind in manchen humanen Tumoren überexprimiert und in einigen Fällen korreliert ihre Expression mit dem Tumorstadium (139). In metastasierenden Melanomzellen konnte eine Überexpression von RhoC nachgewiesen werden (140), aber auch RhoA spielt eine Rolle bei der Invasion von Melanomzellen (141). Erhöhte Expression von Proteinen der Aktin-Assembly-Maschinerie, wie Arp2/3 (actin-related protein) und WAVE2, ist verbunden mit schlechter Prognose für Brust- und Leberkrebspatienten (135, 136) und mit erhöhter Invasion bei Magen- und Kolontumoren (142, 143). Die Herunterregulation von WAVE2 mittels RNAi in murinen Melanomzellen führte zu geringerer Invasivität dieser Zellen (144). Diese Daten unterstreichen die Bedeutung der Aktin-Organisation für die Tumorprogression. RhoB, ein enger Verwandter von RhoA und RhoC, wurde in der Δ TAp73-transfizierten Zelllinie hochreguliert, wie die Array-Analyse ergab. RhoA und RhoC zeigten jedoch keine veränderte Expression. Da diese Proteine aber in ihren Funktionen überlappen, könnte RhoB durchaus an den Veränderungen der Zytoskelettorganisation beteiligt sein. Das Aktin-bündelnde Protein Fascin ist ebenfalls an der Ausbildung von Aktin-Stressfasern beteiligt. Es ist in verschiedenen Tumoren hochreguliert und geht mit einer schlechten Prognose für den Patienten einher (145-147). In dieser Arbeit konnte in den Δ TAp73-exprimierenden Zellen mit invasiverem Phänotyp die Hochregulation von Fascin homolog 1 in der Array-Analyse nachgewiesen werden. Dies könnte, zusammen mit der Hochregulation von RhoB, zum verstärkten Zusammenbau von Aktinfilamenten in diesen Zellen führen.

4.3 Auswirkungen ektopter Expression von Δ TAp73 auf die EMT-Markerproteine Vimentin, E-Cadherin und β -Catenin

Eine andere Komponente des Zytoskeletts stellen die Intermediärfilamente dar. Dazu gehört u.a. Vimentin. Eine Hochregulation von Vimentin in Tumorzellen ist assoziiert mit der epithelialen-mesenchymalen Transition, EMT (85), einem Kennzeichen der Tumordinvasion. Während der EMT verändern sich im Epithelverband verankerte, nicht motile, polarisierte Epithelzellen zu individuellen, nicht polarisierten, motilen und invasiven mesenchymalen Zellen. Diese reversible, morphologische Veränderung geht u.a. einher mit der verstärkten Expression von Vimentin, einem mesenchymalen Markerprotein, dem Verlust der E-Cadherin-Expression (138) und einer Translokation von β -Catenin in den Zellkern (114, 115). Erhöhte Vimentin-Proteinlevel als Antwort auf Δ TAp73-Überexpression konnten in dieser Arbeit weder durch Immunfluoreszenz noch durch Western Blot nachgewiesen werden. Ebenfalls von zentraler Bedeutung für die epitheliale-mesenchymale Transition ist der Verlust der E-Cadherin-Expression. Stark vereinfacht vermittelt E-Cadherin die Integrität der Melanozyten im Epithelverband (209, 210) und sein Verlust stellt ein initiales Ereignis in der Melanomentstehung dar. Die biologische Funktion von E-Cadherin wird in Abschnitt 4.4 dieser Arbeit ausführlich besprochen. Dieses bedeutende Protein für den Prozess der EMT wurde in einer der beiden untersuchten nicht metastasierenden Zelllinien (Mel 5) durch stabile und transiente ektope Expression von Δ TAp73 herunterreguliert.

β -Catenin reguliert über den Wnt-Signalweg EMT, Tumorzellmigration und Tumorzellinvasion (116-118). In der Zelle gibt es zwei β -Catenin-Pools. Zum einen gibt es das membran-assoziierte β -Catenin, das an E-Cadherin gebunden ist und eine Strukturkomponente der Zell-Zell-Verbindungen (*adherens junctions*) darstellt. Dieses verknüpft E-Cadherin mit dem Aktin-Zytoskelett und beeinflusst Adhäsionsprozesse. Zum anderen liegt freies β -Catenin im Zytoplasma und Zellkern vor, das als transkriptioneller Effektor des Wnt-Signalweges agiert (114, 115). Durch Bindung von Wnt an seinen Rezeptor Frizzled werden die Kinasen CK1 (Casein Kinase 1) und GSK3 β (Glycogen-Synthase Kinase 3 β), die β -Catenin phosphorylieren und damit dem Ubiquitin-Proteasom-Abbau zuführen, inhibiert und somit das β -Catenin-Protein stabilisiert. Dieses wird in den Zellkern transloziert und bindet dort an die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF (*T cell factor und lymphocyte enhancing factor*), die u.a. die Transkription der Wnt-Zielgene aktivieren. Ein Zielgen dieses transkriptionellen Komplexes ist Snail1, ein transkriptioneller Repressor von E-Cadherin (149). Auf diese Weise wird die E-Cadherin-Expression während der EMT behindert. Es

wäre möglich, dass die $\Delta TAp73$ -abhängige Suppression der E-Cadherin-Expression über die Aktivierung dieses Repressors abläuft. Andere Targets von β -Catenin sind Cyclin D1, L1-CAM, MMPs (Matrix-Metallo-Proteinasen), S100A4, Fascin (138) u.a., die Zellproliferation, Migration und Invasion in der Zelle beeinträchtigen. Letztlich bewirkt die Aktivierung des Wnt-Signalweges eine verringerte Zell-Zell-Adhäsion und eine erhöhte Zellmigration- und Invasion. Während der EMT kommt es zur nukleären Anreicherung von β -Catenin. Im Experiment in dieser Arbeit zeigten die $\Delta TAp73$ -transfizierten, invasiveren Mel 5-Klone im Vergleich zur parentalen, weniger invasiven Zelllinie eine niedrigere β -Catenin-Konzentration im Zytoplasma und im Zellkern. Es kam zu keiner verstärkten Translokation von β -Catenin in den Zellkern. Dennoch ist eine starke Immunreaktivität gegen β -Catenin im Zellkern nachweisbar, sowohl in der $\Delta TAp73$ -transfizierten, als auch in der Kontrollzelllinie. In der metastasierenden Zelllinie Mel 10 hingegen ist die Konzentration von β -Catenin im Zellkern geringer als im Zytoplasma. Diese Beobachtung deckt sich mit den Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So fanden Kageshita et al. 2001 (122) in fortgeschrittenen Melanomen die Herunterregulation von β -Catenin und Maelandsmo et al. (119) reduzierte Proteinlevel in Melanommetastasen. Im letzteren Fall wurde die Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma von primären superfiziell spreitenden Melanomen sogar mit einer besseren Prognose assoziiert. Sie schlussfolgerten daraus, dass β -Catenin eine protektive Rolle in der Melanomentwicklung spielt, möglicherweise durch Induktion von Apoptose in frühen Melanomstadien. Tatsächlich gibt es Hinweise für eine proapoptotische Funktion von β -Catenin in verschiedenen Tumorzellen (150-152).

Die hier vorgestellten Ergebnisse sprechen dafür, dass $\Delta TAp73$ bestimmte Prozesse der epithelialen-mesenchymalen Transition, z.B. durch negative Regulation von E-Cadherin, beeinflusst. Zusätzliche Anhaltspunkte für diese Theorie bietet die Array-Analyse, die eine differentielle Regulation weiterer EMT-Marker durch $\Delta TAp73$ gezeigt hat, darunter u.a. RHOB, S100A4, TGF-beta und Thrombospondin.

4.4 Auswirkungen ektopter Expression von $\Delta TAp73$ auf die Genexpression

Die stabile Expression von $\Delta TAp73$ in primär nicht metastasierenden Melanomzelllinien führte zu einer Veränderung des Phänotyps hinsichtlich der Malignität und Invasivität der Zellen. Auf der Ebene der Genregulation bewirkte $\Delta TAp73$ eine signifikante Hoch- bzw. Runterregulierung von 1356 Probesets, von denen 169 als sehr relevant für den Prozess der

Tumorprogression in Richtung Metastasierung eingestuft wurden. Darunter zeigten einige Gene auch nach Kurzzeitexpression von ΔTAp73 einen deutlichen Anstieg bzw. eine Reduktion ihrer mRNA.

Hochregulierte Gene

Von den Genen, deren Expression durch ΔTAp73 positiv reguliert wird, sollen an dieser Stelle einige vorgestellt werden. Diese sind S100A2, S100A4, Versican (CSPG2) und $\alpha 1$ -Kollagen18 (COL18A1).

Proteine der S100-Familie S100A2/S100A4

S100A2 gehört zu den Genen, die am stärksten durch Überexpression von ΔTAp73 induziert werden. Im Vergleich zur Kontrollvektor-transfizierten Zelllinie wird durch stabile ΔTAp73 -Expression 15 mal mehr S100A2-mRNA produziert. Dies wurde auch durch transiente Überexpression mittels adenoviralem Gentransfer erreicht. Außerdem aktiviert ΔTAp73 die S100A2-Transkription auch noch nach Zugabe von Cycloheximid, was für einen direkten Aktivierungsmechanismus spricht.

Die Funktion der Mitglieder der S100-Familie Ca^{2+} -bindender Proteine sind vielfältig, dazu gehören Regulation der Zellkontraktion, der Motilität, des Zellwachstums, der Differenzierung, der Zellzyklusprogression und der Transkription (153). S100A2 (CaN19) wird in der Epidermis exprimiert (154) und reguliert die Differenzierung von Keratinozyten (155). Obwohl ursprünglich als Tumorsuppressorgen entdeckt (156) wird S100A2 in vielen Malignitäten überexprimiert, z.B. bei Magenkarzinomen (163), Ovarialkarzinom (164), Lymphom (165), Plattenepithelkarzinom des Halses und Nackens (*head and neck squamous cell carcinoma*) (166-168), ösophageales Plattenepithelkarzinom (*esophageal squamous cell carcinoma*) (169) und Lungenkarzinom (170). Einige Arbeitsgruppen konnten S100A2 sogar mit der Metastasierung von Tumoren in Zusammenhang bringen. Diederichs et al. (171) stellten in Tumormetastasen von Lungenkarzinomen eine Überexpression von S100A2 fest und zeigten in *in-vitro*-Experimenten eine erhöhte transendotheliale Migration von S100A2-exprimierenden Zellen. Bulk et al. (172) konnten die metastatische Kapazität von Lungenkarzinomzellen *in vivo* durch S100A2-Überexpression steigern. Auch in der vorliegenden Arbeit korreliert der S100A2-mRNA-Level mit fortgeschrittener Melanomprogression. So exprimierten die metastasierenden Melanomzelllinien Mel 9 und Mel 10 hohe Mengen S100A2-mRNA im Vergleich zu den weniger invasiven Mel 3 und Mel 5. Die transkriptionelle Regulation von S100A2 durch ΔTAp73 scheint direkt zu sein. Das

überrascht nicht, da S100A2 ein bekanntes Zielgen von Mitgliedern der p53-Familie ist. Der S100A2-Promoter enthält zwei p53/p63/p73-Konsensus-Sequenzen (155,173), an die p53, TAp63, Δ Np63, TAp73 binden. S100A2 wird hochreguliert durch p53 (173, 174), TAp73 (155,173), TAp63 (173) und Δ Np63 (175). Bisher gab es keine Hinweise auf eine positive Regulation von S100A2 durch Δ TAp73. Dieser wurde in der vorliegenden Arbeit erbracht. Allerdings bleibt zu klären, ob Δ TAp73 direkt an den S100A2-Promoter über eine der beiden bekannten Konsensus-Sequenzen bindet.

S100A4 wird auch Metastasin (Mts1) genannt und übernimmt eine kausale Funktion bei der Metastasierung z.B. von Mammakarzinomen (176). S100A4 ist assoziiert mit dem Aktomyosin-Zytoskelett und reguliert die Zellmotilität (177). Die ektope Expression von S100A4 in nicht metastatischen Zellen führt zur Ausbildung eines maligneren Phänotyps (250) und eine Hemmung der S100A4-Expression mittels antisense-RNA resultiert in einer verringerten Zellmotilität (251). Es besteht auch eine Verbindung zwischen S100A4 und dem Tumorsuppressorprotein p53. Grigorian et al. (252) fanden heraus, dass S100A4 mit einer C-terminalen Region von p53 interagiert und dadurch die Phosphorylierung und Aktivierung von p53 beeinflussen kann. In dieser Arbeit zeigte sich, dass S100A4 durch Δ TAp73 hochreguliert wird, der Modus scheint jedoch indirekt zu sein.

Versican (CSPG2)

Ebenfalls sehr stark durch Δ TAp73 hochreguliert (55fach im Vergleich zur Kontrolle) wird Versican, auch CSPG2 (*chondroitin sulfate proteoglycan 2*) genannt. Versican ist ein Proteoglycan der extrazellulären Matrix (ECM). In Säugetieren gibt es vier bekannte Spleißvarianten von Versican V0, V1, V2 und V3-Versican (178). Versican bindet Hyaluronsäure (HA) der ECM, beide sind überexprimiert in Adenokarzinomen des Hundes und agieren zusammen während der Tumorprogression (179). So bewirken die beiden Komponenten eine Auflockerung der Tumorzellumgebung durch die Anreicherung von Wasser in der ECM und erleichtern so Zellmotilität und Tumorstadium (180). Auch haben Versican-haltige ECMs einen anti-adhäsiven Effekt und unterstützen auf diese Weise Tumorzellmigration und Invasion (181). Eine starke Produktion von Versican ist bekannt für verschiedene Tumore (182), so auch für primäre und metastatische Melanome (183, 184). Die Transkription des *CSPG2*-Gens scheint direkt durch Δ TAp73 reguliert zu werden. Es ist bekannt, dass das *CSPG2*-Gen eine *bona-fide*-p53-Bindestelle besitzt, durch die p53 Versican direkt transaktiviert (185). Neueste Studien geben Aufschluss über die Regulation des Versican-Promoters. Domenzain-Reyna et al. (2009) (246) fanden Bindestellen für mehrere

Transkriptionsfaktoren im Versican-Promoter, darunter AP-1, SP1, AP-2 und TCF-4, die die Expression dieses Proteins regulieren. Der TCF-4-Transkriptionsfaktor aktiviert im Komplex mit β -Catenin die Promotoren der Zielgene des Wnt-Signalweges, der in Abschnitt 4.3 ausführlich beschrieben wurde. Versican ist ein bekanntes Zielgen von Wnt (247). Da Δ TAp73 Einfluss auf den Wnt-Signalweg hat, z.B. durch Herunterregulation von E-Cadherin oder Hochregulation eines Wnt-Rezeptors SFRP1 (*secreted frizzled related protein 1*, siehe Abschnitt 4.5), ist es wahrscheinlich, dass die Aktivierung des Versican-Promoters nach ektopter Δ TAp73-Expression wenigstens zum Teil durch die Aktivierung über die TCF-4-Bindestelle stattfindet. Zusätzlich könnte Δ TAp73 die Versican-Expression über die SP1-Bindestellen regulieren. Racek et al. (248) und Beitzinger et al. (249) beschrieben die SP1-abhängige Repression des hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*)-Promoters durch p73. So bildet p73 einen Komplex mit Sp1, sodass Sp1 nicht mehr an die SP1-Bindestellen im hTERT-Promoter binden kann. Auf ähnliche Weise könnte p73 auch die Versican-Expression kontrollieren. Δ TAp73 würde dann durch Bildung von TAp73- Δ TAp73-Heterooligomeren die Bildung der p73-SP1-Komplexe unterbinden und somit SP1 dem Promoter zugänglich machen. Dieser Mechanismus ist vorerst reine Spekulation und müsste im Experiment überprüft werden.

COL18A1/Endostatin

Das Heparansulfat-Proteoglycan (HSPG) α 1-Kollagen18 wird nach ektopter Expression von Δ TAp73 in Melanomzelllinien verstärkt exprimiert. Der C-Terminus von α 1-Kollagen18, einem Bestandteil der ECM und von Basalmembranen, enthält eine NC1-Domäne (Non-Collagen1), aus der durch Proteolyse ein 20kDa-Fragment mit anti-angiogenetischer Funktion, Endostatin, freigesetzt wird (186). Endostatin behindert die Zellmotilität von Endothelzellen über FGF-2-Signalwege (187) und induziert Apoptose und Zellzyklusarrest in Endothelzellen durch Inhibition von CyclinD1 (188, 189). Endostatin-haltige Peptide werden aus α 1-Kollagen18 durch die proteolytische Aktivität von MMPs, Elastase und Cathepsin (190, 191) gebildet. Sie entstehen also in Arealen intensiven ECM-Abbaus, wie zum Beispiel im Tumorendothel während der Tumorzellinvasion und wirken der Tumorangiogenese entgegen. Obwohl Endostatin die Tumorprogression negativ reguliert, gelten hohe Serumlevel von Endostatin in Patienten als Tumormarker für humane kolorektale Karzinome, Lungenkarzinome (192, 193), Nierenzellkarzinome (194) und bei akuter myeloider Leukämie (195) und korrelieren z.T. mit einem schlechtem Ausgang der Krankheit. Patienten mit Melanomen haben erhöhte Endostatin-Serum-Werte beim Auftreten von lokoregionalen und

entfernten Metastasen (Stadium III und Stadium IV) (196). Warum kommt es aber während voranschreitender Tumorprogression zum Anstieg von Endostatin? Es gibt verschiedene Theorien. Manche behaupten, Endostatin entsteht nur als zufälliges Nebenprodukt der MMP-Aktivität während der Tumorzellinvasion (197), das ohne Effekt ist, da es durch pro-angiogenetische Faktoren unterdrückt wird. Abe et al. (198) vermuten, dass Endostatin in einigen Tumoren hochreguliert wird, um angiogenetischen Stimuli nahe von Tumorblutgefäßen entgegenzuwirken, sozusagen als intrinsischen Schutzmechanismus des Organismus gegen die Verbreitung von maligne entarteten Zellen. Für diese Theorie spricht, dass Endostatin nur anti-angiogenetisch wirkt unter Stimulation von Wachstumsfaktoren, wie FGF-2 (187) und dass das Tumorsuppressorprotein p53 α 1-Kollagen18 und eine Prolyl-Hydrolase, die Endostatin daraus herstellt, hochreguliert (199, 200). COL18A1 ist ein direktes transkriptionelles Target von p53 (200). Auf welche Weise Δ TAp73 die Expression von α 1-Kollagen18 bzw. Endostatin beeinflusst, ob durch direkte Bindung oder durch indirekte Mechanismen, muss noch geklärt werden.

Negativ regulierte Gene

Die transaktivierungsdefiziente Form von p73 regulierte u.a. folgende Gene, auch nach transienter Δ TAp73-Expression, herunter: E-Cadherin, MMP-8, SEMA6A, CHL1, DPP4.

E-Cadherin

E-Cadherin (CDH1) spielt gerade in der Melanomprogression eine sehr bedeutenden Rolle. In den meisten epithelialen Tumoren kommt es während der Tumorprogression zum Verlust der CDH1-Expression und dies korreliert mit schlechter Prognose und Metastasenbildung (206, 207).

E-Cadherin ist ein transmembranes Glycoprotein, dass in den Zell-Zell-Verbindungen, den sog. *Adherens junctions*, z.B. zwischen Melanozyten und Keratinozyten, lokalisiert ist (208). Durch verringerte E-Cadherin-Proteinlevel kommt es zur Unterbrechung der Melanozyten-Keratinozyten-Kontakte (209, 210) und einzelne Melanozyten können den Epithelverband verlassen. Die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin bindet β -Catenin, das einerseits die Verbindung zum Zytoskelett vermittelt und andererseits die Beteiligung von E-Cadherin an Signalprozessen, wie z.B. dem Wnt-Signalweg ermöglicht (138). E-Cadherin ist demnach involviert in Zell-Zell-Adhäsion, Organisation des Zytoskeletts und epithelial-mesenchymaler Transition (EMT), denn diese wird durch den Wnt-Signalweg induziert. Die Expression von E-Cadherin kann auf verschiedene Arten reguliert werden: Es gibt transkriptionelle

Repressoren Snail, Slug (Snail2), Twist (149) und andere. Erstere werden während der EMT durch Wachstumsfaktoren wie HGF und TGF- β induziert (211, 212). Der Einfluss von Δ TAp73 auf die CDH1-Expression könnte also über die Regulation der Repressoren erfolgen. In der Microarray-Analyse konnte keine Hochregulation von Snail, Slug oder Twist durch Δ TAp73-Überexpression nachgewiesen werden. Da die Runterregulation von E-Cadherin deutlicher auf Proteinebene als auf mRNA-Ebene erkennbar war, könnten auch posttranslationale Mechanismen dafür verantwortlich sein, wie Glycosylierung, Proteolyse oder Phosphorylierung und anschließender Ubiquitinierung, wie es für E-Cadherin berichtet wird (138).

MMP-8

Ein anderes Gen, das sehr deutlich durch Δ TAp73 herunterreguliert wird ist die Matrix-Metallo-Proteinase MMP-8. Das erscheint zunächst seltsam, da MMPs normalerweise bei fortschreitender Tumorprogression verstärkt exprimiert werden, da sie Komponenten der extrazellulären Matrix und Basalmembran abbauen und somit die Migration und Invasion von Tumorzellen ermöglichen. Für MMP-8 gibt es jedoch auch gegenteilige Beobachtungen. So wurde im Vergleich von nicht-metastasierenden zu metastasierenden Brustkrebs-Zelllinien eine hohe Konzentration von MMP-8 in den nicht metastasierenden Zellen festgestellt (86). In einem Knockout-Maus-Modell wurde in männlichen MMP8^{-/-}-Tieren die verstärkte Bildung von Hauttumoren beobachtet (87). Diese Daten lassen darauf schließen, dass die Herunterregulierung von MMP-8 die Tumorprogression vorantreiben kann.

SEMA6A

SEMA6A gehört zur Familie der Semaphorine, die aus sezernierten oder Transmembranproteinen besteht, die als Gemeinsamkeit eine konservierte SEMA-Domäne aufweisen (213, 214). SEMA6 ist membranständig. Semaphorine interagieren mit ihren Rezeptoren, den Plexinen, über die SEMA-Domäne, die ebenfalls in Plexinen vorkommt (215). Plexine regulieren die Aktivität von Rho-GTPasen (Rho, Rac, Cdc42), die an der Kontrolle der Zellmotilität und der Aktin- und Mikrotubuli-Dynamik beteiligt sind. RhoA wird aktiviert durch PlexinB1 (216). R-Ras hingegen wird durch Plexine inaktiviert, was wiederum die R-Ras-vermittelte Integrin-abhängige Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix (ECM) blockiert (217). Auf diese Weise könnten Semaphorin-Plexin-Signalwege die Tumormetastasierung unterdrücken. Dhanabal et al. (218) zeigten, dass eine rekombinante Ektodomäne von SEMA6A die VEGF-vermittelte Migration von Endothelzellen blockieren

kann, was einen negativen Effekt auf die Tumorangiogenese hat. Neueste Forschungsergebnisse (219) dokumentieren eine SEMA6A-Form, die mit β -Aktin und damit dem Zytoskelett assoziiert ist. Dies deutet auf eine Funktion von SEMA6A bei der Regulation der Zytoskelettorganisation hin.

CHL1

CHL1 (*Close Homologue of L1*) ist Mitglied der Familie der L1-CAM Zelladhäsionsproteine, die wiederum zur Immunglobulin-Superfamilie der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle gehört (220). Die L1-CAM-Familie besteht aus vier Mitgliedern: L1, CHL1, NrCAM und Neurofascin. L1 und CHL1 sind Korezeptoren von β 1-Integrinen und vermitteln mit diesen Migration von Neuronen und Neuriten-Wachstum (221, 222). Der CHL1- β 1-Integrin-Signalweg beinhaltet c-Src, PI3K und ERK1/2 (223). Die Expression von L1 steht in engem Zusammenhang mit der Progression von verschiedenen Tumoren, darunter auch Melanome (224-226), dabei korreliert hohe L1-Expression mit Metastasierung. Für CHL1 gibt es keine derartigen Berichte. Aber eine Gruppe fand bei der Untersuchung von *esophageal squamous cell carcinomas* (ESCC) eine deletierte Region, die vermutlich Tumorsuppressorgene enthält. Unter den herunterregulierten Tumorsuppressorkandidaten in ESCC-Tumoren befand sich auch das *CHL1*-Gen. Diese Ergebnisse sprechen für unterschiedliche, eventuell sogar gegensätzliche Funktionen von L1 und CHL1 in der Tumorigenese.

DPP4

Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4, CD26) ist eine Serin-integrale Membran-Peptidase (SIMP), die Prolin-haltige Peptide und Makromoleküle spaltet und auf der Zelloberfläche aktiv ist (230). Zu den potentiellen Substraten von DPP4 gehören Zytokine, hämatopoeitische Wachstumsfaktoren, Neuropeptide, Hormone und Chemokine mit X-Pro- oder X-Ala-Motiv am N-Terminus. Zusätzlich besitzt DPP4 auch Gelatinase-Aktivität, um Kollagene aus der ECM zu degradieren. Damit kann DPP4 die Invasion von Tumorzellen unterstützen.

4.5 Signalwege, die von Δ TAp73 reguliert werden

Auf der Basis der potentiellen Δ TAp73-Targets, die in der Array-Analyse identifiziert worden sind, wurde mit Hilfe des Programms Pathway Architect™ der Firma Stratagene ein Interaktions-Netzwerk erstellt, welches direkte Interaktionen zwischen den jeweiligen Proteinen darstellt (Abb. 4.1). Pathway Architect™ bedient sich dazu der Pubmed-Datenbank,

indem es die Veröffentlichungen hinsichtlich Interaktionen zwischen jeweils zwei Proteinen analysiert. Die von Δ TAp73 regulierten Gene sind an zwei zentralen Signalwegen beteiligt: dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg und dem TGF- β -Signalweg. Diese sind maßgeblich an der Regulation von Zellmotilität und EMT beteiligt. Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, die durch Δ TAp73 reguliert werden, sind SFRP1 (*secreted frizzled related protein 1*), ein Wnt-Rezeptor, CDH1 (Cadherin 1, E-Cadherin), an welches β -Catenin gebunden ist und SOX6, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von CDH1 induzieren kann (235). Da CDH1 und SOX6 durch Δ TAp73 herunterreguliert werden, führt dies zu einem positiven Einfluss auf den Wnt-Weg und somit zu erhöhter Zellmotilität.

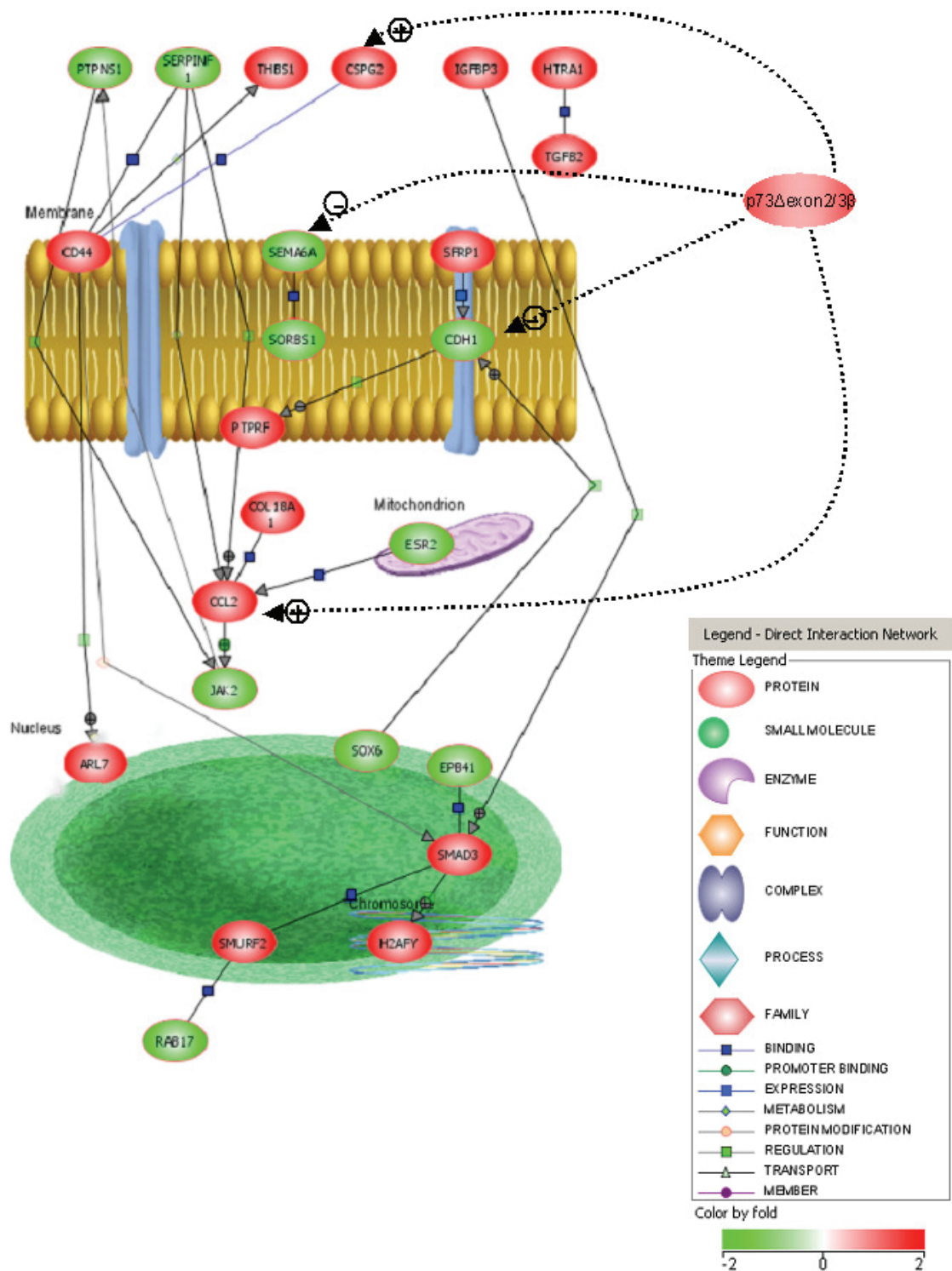


Abb. 4.1 Direktes Interaktions-Netzwerk der aus der Array-Analyse ermittelten Δ TAp73-Targets. Die Funktion von Δ TAp73 ist z.T. spekulativ und wurde nachträglich eingefügt.

Ein Zielgen von Wnt ist CD44. Auch die Expression von CD44 wurde im Microarray durch Δ TAp73 hochreguliert, dies könnte aber auch ein indirekter Effekt durch die verstärkte Wnt-Signaltransduktion sein. CD44 ist ein Rezeptor für Hyaluronsäure (HA), welche eine wichtige Komponente der ECM ist (236). Es existieren mehrere Spleiß-Isoformen von CD44, von denen einige mit der Tumorprogression von humanen Neoplasmen in Zusammenhang

gebracht wurden (236). CD44 wird auch von TGF- β induziert (4). Der TGF- β -Signalweg wird durch die dauerhafte Expression von Δ TAp73 in Melanomzellen ebenfalls aktiviert. Smad3, ein Vermittler der TGF- β -Antwort in der Zelle (237, 238), wird hochreguliert. Ebenso IGFBP3 (*insulin-like growth factor-binding protein 3*), welches mit dem TGF- β -Weg interagiert, indem es die Phosphorylierung von TGF- β -Rezeptoren und Smads stimuliert (239). Es gibt sogar Forschungsergebnisse, die belegen, dass IGFBP3 ein wichtiger Faktor für die Metastasierung von Melanomen ist (240). Verstärkte TGF- β -Signale können in Melanomen die Metastasierung begünstigen (241-243).

Ein anderer Signalweg auf den Δ TAp73 Einfluss nimmt ist der JAK/STAT-Signalweg. JAKs sind Tyrosinkinasen, die nach Bindung von Zytokinen an ihre Rezeptoren diese phosphorylieren und somit die Signalweiterleitung initiieren (244). JAK2 vermittelt u.a. die Antwort auf Interferon γ (IFN γ) (245), dessen antiproliferativer Effekt auf Tumorzellen therapeutisch genutzt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reduktion der Expression von JAK2 durch Δ TAp73 im Microarray beobachtet. Die Resistenz von Tumorzellen auf IFN γ -Behandlung könnte auf Defekten im JAK/STAT-Signalweg beruhen (244). Somit würden niedrigere JAK2-Proteinlevel die Tumorprogression unterstützen

4.6 Wie regulieren Transaktivierungs-defiziente p73-Isoformen die Expression von Zielgenen und somit die Tumorprogression?

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Transaktivierungs-defiziente Isoformen des Tumorsuppressorproteins p73 kardinale Signalwege der Tumorprogression regulieren können. Sie verändern die Expression von zentralen Komponenten wichtiger Signalwege, wie E-Cadherin und β -Catenin auf transkriptioneller und translationeller Ebene. Zusätzlich können sie Tumorprogressions-relevante Genprodukte induzieren, wie S100-Proteine oder Versican. Obwohl die Transaktivierungsdomäne im Δ TAp73-Transkript fehlt, kann dieses einen Einfluss auf die Expression von Zielgenen ausüben.

Vorab sei gesagt, dass die Antwort auf obige Frage in dieser Arbeit nicht beantwortet werden konnte. Dennoch gibt es in der Literatur einige Hinweise auf mögliche Mechanismen, über die Δ TAp73 die Expression von Genen beeinflussen kann.

Von großer Bedeutung ist mit Sicherheit die dominant negative Aktivität von Δ TAp73-Isoformen gegenüber TAp73 und p53. Beide Tumorsuppressorproteine werden von Δ TAp73 über kompetitive Bindung an DNA-Bindestellen gehemmt. Da die N-terminalen p73-Isoformen noch an die DNA binden können, aufgrund der fehlenden Transaktivierungsdomäne aber keine Zielgene mehr aktivieren können, wird so die Funktion

von p53 und Volllängen-p73 behindert. Zusätzlich dazu wird die Funktion von Volllängen-p73 durch Bildung von defekten Heterooligomeren aus Δ TAp73 und TAp73 gehemmt (63). Die Zielgene von p53 und TAp73 werden auf diese Weise herunterreguliert. Wenn diese Zielgene Inhibitoren anderer Gene sind, erfolgt auf diese Weise eine indirekte Aktivierung von Genen durch Δ TAp73.

Eine andere Möglichkeit der Genregulation durch transaktivierungsdefiziente p73-Isoformen zeigten Beitzinger et al. (249) am hTERT-Promoter. Es war bekannt, dass TAp73 die Promoteraktivität der *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT) reprimiert indem p73 an den Transkriptionsfaktor SP1 bindet und dessen Bindung an SP1-Bindestellen im Promoter und demzufolge die Transaktivierung verhindert (248). Δ TAp73 hebt die hTERT-Repression durch p73 auf und aktiviert sogar den hTERT-Promoter (249). Dies geschieht zum einen durch die dominant negative Aktivität gegenüber TAp73. Auf diese Weise könnten auch andere Gene, die SP1-abhängig transaktiviert werden durch Δ TAp73 hochreguliert werden, wie z.B. Versican, das mehrere SP1-Bindestellen im Promoter aufweist (246). Zusätzlich dazu fanden Beitzinger et al. noch heraus, dass Δ TAp73 den hTERT-Promoter unabhängig von der dominant negativen Hemmung aktiviert. Δ TAp73 bewirkt die Hyperphosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins RB (97), das dadurch inaktiviert wird. In der aktiven Form (hypophosphoryliert) reprimiert RB in einem repressiven Komplex mit E2F und Histondeacetylase (HDAC) den hTERT-Promoter. Dieser RB-E2F-HDAC-Komplex bindet an den hTERT-Promoter über eine Non-Konsensus-E2F-Bindestelle. Die Hyperphosphorylierung von RB bewirkt die Auflösung des inhibitorischen Komplexes und aktiviert somit den Promoter. Dieser Mechanismus ist ebenfalls denkbar für Gene, deren Promotoren diese Non-Konsensus-E2F-Bindestellen aufweisen.

Viele der in der Array-Analyse gefundenen Zielgene von Δ TAp73 werden mit Sicherheit indirekt reguliert. Aber für Versican und S100A2 sprechen die Ergebnisse für einen direkten Mechanismus, da diese Gene trotz Behandlung mit Cycloheximid, welches die de-novo-Proteinsynthese hemmt, durch Δ TAp73 hochreguliert werden. Es ist also wahrscheinlich, dass zusätzlich zu den o.g. möglichen Aktivierungsmechanismen noch weitere bisher unbekannte Wege existieren, über die Δ TAp73 die Transkription von Zielgenen direkt reguliert. Möglicherweise interagiert Δ TAp73 mit anderen Transkriptionsfaktoren und bildet aktivierende Komplexe, die an Zielpromotoren binden und diese aktivieren.

Unabhängig vom Modus, demonstriert die vorliegende Arbeit, dass Δ TAp73 Einfluss auf wichtige zelluläre Prozesse, wie Adhäsion, Zellmotilität, Zytoskelettorganisation und Chemoresistenz von Melanomzellen *in vitro* ausübt. Diese Zellprozesse sind bedeutend für

die Ausbildung eines maligneren Phänotyps von Tumorzellen während der Tumorprogression. Bisher gab es viele Erkenntnisse über die Rolle von Δ TAp73 bei der malignen Transformation von Zellen und in frühen Stadien der Tumorigenese. Diese Arbeit liefert Hinweise für eine Beteiligung von Δ TAp73 in späteren Stadien der Melanomprogression.

4.7 Ausblick

Diese Arbeit zeigt, dass Δ TAp73 Eigenschaften von Tumorzellen *in vitro* beeinflusst und somit die Ausbildung eines maligneren Phänotyps unterstützt. Die Relevanz dieses Effekts muss in *in-vivo*-Studien geprüft werden. Es stellt sich die Frage, ob Zellen mit hoher Δ TAp73-Expression nach subkutaner oder intravenöser Injektion in Mäuse auch aggressivere Tumoren bilden mit schnellerer bzw. ausgedehnterer Metastasierung. Interessant wäre auch zu überprüfen, ob die Tumorprogression von Melanomzellen durch spezifische Inhibierung von Δ TAp73 aufgehalten oder sogar umgekehrt werden kann. Dies könnte *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Eine wichtige Frage, die die Ergebnisse dieser Arbeit aufwerfen ist die folgende: Wie kann Δ TAp73 die Tumorprogression von Melanomzellen vorantreiben? Durch den dominant negativen Effekt gegenüber p53 und p73, durch direkte Transaktivierung von progressiven Zielgenen, durch aktivierende Protein-Protein-Interaktionen zwischen Δ TAp73 und anderen Aktivatorproteinen oder durch einen völlig anderen Modus operandi? Dazu müsste man klären, ob Δ TAp73 selbst an Promotoren von Zielgenen bindet. Dies könnte mittels Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) getestet werden. Die Aktivierung dieser Promotoren könnte man dann mit Reportergenanalysen (z.B. Luciferase) untersuchen. Diese zeigen auch, ob Δ TAp73 allein die Aktivierung bewirkt oder ob Interaktionen mit anderen Proteinen notwendig sind. Ebenso könnte man mit Immunpräzipitationen mögliche Interaktionspartner von Δ TAp73 identifizieren.

5 Zusammenfassung

N-Terminal verkürzte, Transaktivierungsdefiziente Isoformen (Δ TAp73) des Tumorsuppressors p73 besitzen onkogene Kapazität, indem sie die Funktion von p53 und Vollängen-p73 inhibieren. Vorherige Arbeiten lieferten Hinweise dafür, dass bestimmte Δ TAp73-Varianten eine Rolle bei der Melanomprogression spielen könnten. In dieser Arbeit wurden nicht invasive Melanomzelllinien stabil mit einem Δ TAp73-Expressionsplasmid transfiziert und der Einfluss der Langzeitexpression von Δ TAp73 auf verschiedene Zelleigenschaften *in vitro* untersucht. Die Effekte waren verstärkte Koloniebildung im Softagar, erhöhte Zellinvasivität- und Motilität *in vitro*, stärkere Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix, veränderte Organisation des Aktin-Zytoskeletts und erhöhte Chemoresistenz der Zellen. Die Microarray-Analyse ergab eine differentielle Regulation zahlreicher Gene durch die Langzeitexpression von Δ TAp73. Darunter sind viele Gene, die an der Tumorprogression beteiligt sind (z.B. E-Cadherin, Versican und Proteine der S100-Familie). Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine Beteiligung von Δ TAp73 an der Melanomprogression durch Induktion eines maligneren Phänotyps der Melanomzellen.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Mayo Clinic Proceedings. Mayo Clinic. 2007 Mar;82(3):364-80.
Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis.
Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET
- 2) Der Onkologe, 2004 Jul;10(7): 688-700(13)
Epidemiologie und Risikofaktoren des malignen Melanoms
Blum, A.; Garbe, C.; Bauer, J.
- 3) Photochemistry and Photobiology. 2004 Feb;79(2):211-6.
Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin.
Meredith P, Riesz J
- 4) Pigment Cell Research. 2007 Jun;20(3):161-72.
Melanoma invasion - current knowledge and future directions.
Gaggioli C, Sahai E.
- 5) The Journal of Investigative Dermatology. 1993 Mar;100(3):342S-345S.
Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent.
Guerry D 4th, Synnestvedt M, Elder DE, Schultz D.
- 6) Mayo Clin Proc. 2007 Apr;82(4):490-513.
Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment.
Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET; Melanoma Study Group of Mayo Clinic Cancer Center.
- 7) Cancer Research. 1969; 29:705-727.
The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin.
Clark WH, Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC.
- 8) The American Journal of Pathology. 1969 Apr;55(1):39-67.
Lentigo maligna and lentigo-maligna melanoma.
Clark WH Jr, Mihm MC Jr.
- 9) Journal of Clinical Oncology. 2001 Aug 15;19(16):3635-48.
Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma.
Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF.
- 10) Cancer. 1953 Jan;6(1):1-45.

Malignant melanoma; a clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis.

Allen AC, Spitz S.

11) Cancer. 2000 May 15;88(10):2398-424.

The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer.

Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K, Edwards BK.

12) Current Opinion in Oncology. 1993 Mar;5(2):358-63.

Etiology, epidemiology, risk factors, and public health issues of melanoma.

Goldstein AM, Tucker MA.

13) Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. 2005 Mar;14(3):562-6.

Tanning beds, sunlamps, and risk of cutaneous malignant melanoma.

Gallagher RP, Spinelli JJ, Lee TK.

14) Cancer. 1999 Dec 1;86(11 Suppl):2464-77.

The genetics of hereditary melanoma and nevi. 1998 update.

Greene MH.

15) Journal of the American Academy of Dermatology. 1993 Apr;28(4):558-64.

Familial and cutaneous features of dysplastic nevi: a case-control study.

Tucker MA, Crutcher WA, Hartge P, Sagebiel RW.

16) Journal of Investigative Dermatology. 1994 Nov;103(5 Suppl):112S-116S.

Genetics of cutaneous melanoma.

Meyer LJ, Zone JH.

17) Journal of the American Academy of Dermatology. 2004 Nov;51(5):803-8.

Genetic testing in hereditary melanoma.

Tsao H, Niendorf K.

18) Journal of Investigative Dermatology. 2004 Feb;122(2):337-41.

Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma.

Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG.

19) The American Journal of Dermatopathology. 1984 Summer;6 Suppl:55-61.

Invasive malignant melanomas lacking competence for metastasis.

Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Zehngebot L, Lusk E, Van Horn M, Clark WH Jr.

20) Cancer Control Journal of the Moffitt Cancer Center. 1995 September/October, Vol 2
Melanoma Metastasis.

Fidler IJ.

21) Cancer Research. 1986 Feb;46(2):467-73.

How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture.

Folkman J.

22) Melanoma Research. 1993 Feb;3(1):5-14.

The possible role of angiogenesis in the metastatic potential of human melanoma.
Clinicopathological aspects.

Denijn M, Ruiter DJ.

23) Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2002 Oct;44(1):1-15.

Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intercellular communication in the progression of melanoma.

Bogenrieder T, Herlyn M.

24) Cancer Metastasis Reviews. 1999;18(3):345-57.

Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma.

Johnson JP.

25) Cancer Research. 2004 Jul 15;64(14):4810-6.

Identification of an active site on the laminin alpha5 chain globular domain that binds to CD44 and inhibits malignancy.

Hibino S, Shibuya M, Engbring JA, Mochizuki M, Nomizu M, Kleinman HK.

26) Journal of Cell Science. 1994 Apr;107 (Pt 4):983-92.

E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro.

Tang A, Eller MS, Hara M, Yaar M, Hirohashi S, Gilchrest BA.

27) The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings. 1996 Apr;1(2):188-94.

Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas.

Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M.

28) Cell. 1991 Jul 12;66(1):107-19.

Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role.

Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F.

29) Cancer. 1997 Oct 15;80(8 Suppl):1529-37.

General mechanisms of metastasis.

Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA.

30) Cancer Cells. 1991 Aug;3(8):308-11.

Basic fibroblast growth factor in human melanoma.

Rodeck U, Becker D, Herlyn M.

31) Journal of Immunology. 1993 Sep 1;151(5):2667-75.

IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor.

Schadendorf D, Möller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM.

32) Oncogene. 2000 Apr 6;19(15):1885-90.

Analysis of p73 in human borderline and invasive ovarian tumor.

Ng SW, Yiu GK, Liu Y, Huang LW, Palnati M, Jun SH, Berkowitz RS, Mok SC.

- 33) *Nature*. 2000 Mar 2;404(6773):99-103.
p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours.
Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F, Caput D.
- 34) *Cancer Research*. 1988 Sep 1;48(17):5036-41.
Incidence of cutaneous melanoma in the United States by histology with special reference to the face.
Newell GR, Sider JG, Bergfelt L, Kripke ML.
- 35) *British Journal of Cancer*. 1996 Apr;73(7):940-4.
Comparison between lentigo maligna melanoma and other histogenetic types of malignant melanoma of the head and neck. Scottish Melanoma Group.
Cox NH, Aitchison TC, Sirel JM, MacKie RM.
- 36) *Seminars in Diagnostic Pathology*. 1993 Feb;10(1):47-75.
The histopathology of cutaneous malignant melanoma.
Barnhill RL, Mihm MC Jr.
- 37) *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999 Dec;41(6):945-9.
Clinicopathologic analysis of malignant melanoma in Taiwan.
Chen YJ, Wu CY, Chen JT, Shen JL, Chen CC, Wang HC.
- 38) *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*. 1994 Dec;20(12):817-22.
Acral lentiginous melanoma. A histological type without prognostic significance.
Cascinelli N, Zurrida S, Galimberti V, Bartoli C, Bufalino R, Del Prato I, Mascheroni L, Testori A, Clemente C.
- 39) *Archives of Surgery*. 1992 Apr;127(4):392-9.
Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma.
Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ
- 40) *Annals of Surgery*. 1996 Feb;223(2):217-24.
Intraoperative radio-lympho-scintigraphy improves sentinel lymph node identification for patients with melanoma.
Albertini JJ, Cruse CW, Rapaport D, Wells K, Ross M, DeConti R, Berman CG, Jared K, Messina J, Lyman G, Glass F, Fenske N, Reintgen DS.
- 41) *Journal of Clinical Oncology*. 2004 Sep 15;22(18):3677-84.
Factors predictive of tumor-positive nonsentinel lymph nodes after tumor-positive sentinel lymph node dissection for melanoma.
Lee JH, Essner R, Torisu-Itakura H, Wanek L, Wang H, Morton DL.
- 42) *Journal of Clinical Oncology*. 2002 Dec 1;20(23):4549-54.
Prolonged survival after complete resection of disseminated melanoma and active immunotherapy with a therapeutic cancer vaccine.
Hsueh EC, Essner R, Foshag LJ, Ollila DW, Gammon G, O'Day SJ, Boasberg PD, Stern SL, Ye X, Morton DL.

- 43) Cancer Treatment Reports. 1976 May;60(5):595-600.
Randomized prospective trial of DTIC (NSC-45388) alone versus BCNU (NSC-409962) plus vincristine (NSC-67574) in the treatment of metastatic malignant melanoma.
Bellett RE, Mastrangelo MJ, Laucius JF, Bodurtha AJ.
- 44) Journal of Clinical Oncology. 1999 Jul;17(7):2105-16.
High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993.
Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Abrams J, Sznol M, Parkinson D, Hawkins M, Paradise C, Kunkel L, Rosenberg SA.
- 45) The Cancer Journal from Scientific American. 1997 Dec;3 Suppl 1:S9-15.
Development and results of biochemotherapy in metastatic melanoma: the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience.
Legha SS, Ring S, Eton O, Bedikian A, Plager C, Papadopoulos N.
- 46) Annals of Oncology. 1996 Oct;7(8):827-35.
Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon-alpha.
Legha SS, Ring S, Bedikian A, Plager C, Eton O, Buzaid AC, Papadopoulos N.
- 47) Cancer Research. 2006 Feb 1;66(3):1611-9.
The Raf inhibitor BAY 43-9006 (Sorafenib) induces caspase-independent apoptosis in melanoma cells.
Panka DJ, Wang W, Atkins MB, Mier JW.
- 48) Seminars in Cancer Biology. 1998;8(5):345-57.
Regulation of p53 downstream genes.
El-Deiry WS.
- 49) The Journal of Pathology. 1999 Jan;187(1):112-26.
The p53 pathway.
Prives C, Hall PA.
- 50) The Journal of Investigative Dermatology/ Symposium Proceedings. 1996 Apr;1(2):115-8.
p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and molecular epidemiology.
Harris CC.
- 51) Cell. 1997 Aug 22;90(4):809-19.
Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers.
Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D.
- 52) Nature Medicine. 1998 Jul;4(7):747-8.
A new human p53 homologue.
Trink B, Okami K, Wu L, Sriuranpong V, Jen J, Sidransky D.

- 53) Molecular Cell. 1998 Sep;2(3):305-16.
p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities.
Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F.
- 54) Nature Reviews. Cancer. 2002 Aug;2(8):605-15.
p73: Friend or foe in tumorigenesis.
Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH.
- 55) Nature. 1999 Jun 24;399(6738):806-9.
The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage.
Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG Jr, Levrero M, Wang JY.
- 56) Cell. 2000 Jul 7;102(1):55-66.
Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage.
Agami R, Bernards R.
- 57) Nature. 1999 Jun 24;399(6738):814-7.
p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage.
Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY, Lu H, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D.
- 58) Apoptosis. 2001 Dec;6(6):447-52.
p73 in apoptosis.
Stiewe T, Pützer BM.
- 59) Nature. 1997 Sep 11;389(6647):191-4.
p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis.
Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr.
- 60) Japanese Journal of Cancer Research. 2000 Feb;91(2):174-80.
Adenovirus-mediated transfer of p53-related genes induces apoptosis of human cancer cells.
Ishida S, Yamashita T, Nakaya U, Tokino T.
- 61) Molecular Medicine Today. 1999 Sep;5(9):387-92.
The p53 family: same response, different signals?
Chen X.
- 62) Cell. 2000 Nov 22;103(5):691-4.
p53: death star.
Vousden KH.
- 63) Cell Death and Differentiation. 2002 Mar;9(3):237-45.
Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene?
Stiewe T, Pützer BM.
- 64) Apoptosis. 2001 Feb-Apr;6(1-2):17-29.
Role of the newer p53 family proteins in malignancy.

Irwin MS, Kaelin WG Jr.

65) *Oncogene*. 2001 Aug 23;20(37):5111-7.

Acquired expression of transcriptionally active p73 in hepatocellular carcinoma cells.

Sayan AE, Sayan BS, Findikli N, Ozturk M.

66) *Cancer Research*. 2002 Jul 1;62(13):3598-602.

Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene.

Stiewe T, Zimmermann S, Frilling A, Esche H, Pützer BM.

67) *Oncogene*. 2001 Jan 25;20(4):514-22.

Transactivation-deficient p73alpha (p73Deltaexon2) inhibits apoptosis and competes with p53.

Fillippovich I, Sorokina N, Gatei M, Haupt Y, Hobson K, Moallem E, Spring K, Mould M, McGuckin MA, Lavin MF, Khanna KK.

68) *The Journal of Biological Chemistry*. 2002 Apr 19;277(16):14177-85. Epub 2002 Feb 13.

Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis.

Stiewe T, Theseling CC, Pützer BM

69) *International Journal of Cancer*. 2004 Jan 1;108(1):162-6.

Alterations of DeltaTA-p 73 splice transcripts during melanoma development and progression.

Tuve S, Wagner SN, Schitteck B, Pützer BM.

70) *Clinical Cancer Research*. 2004 Jan 15;10(2):626-33.

Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas.

Stiewe T, Tuve S, Peter M, Tannapfel A, Elmaagacli AH, Pützer BM.

71) *The Biochemical Journal*. 2001 Jun 15;356(Pt 3):859-66.

Transcriptional activities of p73 splicing variants are regulated by inter-variant association.

Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Chiba T, Shimotohno K.

72) *Journal of the National Cancer Institute*. 1999 Jul 7;91(13):1154-8.

Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma.

Tannapfel A, Wasner M, Krause K, Geissler F, Katalinic A, Hauss J, Mössner J, Engeland K, Wittekind C.

73) *Brain Pathology*. 2001 Jul;11(3):296-305.

p73 is not mutated in meningiomas as determined with a functional yeast assay but p73 expression increases with tumor grade.

Nozaki M, Tada M, Kashiwazaki H, Hamou MF, Diserens AC, Shinohe Y, Sawamura Y, Iwasaki Y, de Tribolet N, Hegi ME.

74) *Clinical Cancer Research*. 2002 Jan;8(1):165-70.

p73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinoma.

Sun XF.

75) *Human Pathology*. 2002 Feb;33(2):158-64.

Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis.

Choi HR, Batsakis JG, Zhan F, Sturgis E, Luna MA, El-Naggar AK.

76) Japanese Journal of Clinical Oncology. 2003 May;33(5):215-20.

p73 Overexpression and angiogenesis in human colorectal carcinoma.

Guan M, Peng HX, Yu B, Lu Y.

77) International Journal of Oncology. 2002 Jul;21(1):43-8.

Expression of p16, p27, p53, p73 and Nup88 proteins in matched primary and metastatic melanoma cells.

Zhang H, Schneider J, Rosdahl I.

78) Journal of Clinical Oncology. 2006 Feb 10;24(5):805-15. Epub 2005 Dec 27.

DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1.

Dominguez G, García JM, Peña C, Silva J, García V, Martínez L, Maximiano C, Gómez ME, Rivera JA, García-Andrade C, Bonilla F.

79) Nature. 2001 Jan 11;409(6817):207-11.

Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma.

Soengas MS, Capodieci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardó C, Lowe SW.

80) American Journal of Pathology. 1991 Aug;139(2):423-35.

Cell migration and actin organization in cultured human primary, recurrent cutaneous and metastatic melanoma. Time-lapse and image analysis.

Byers HR, Etoh T, Doherty JR, Sober AJ, Mihm MC Jr.

81) The Journal of Cell Biology. 1994 Feb;124(4):619-26.

Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis.

Frisch SM, Francis H.

82) Apoptosis. 2006 Feb;11(2):235-43.

Adenovirus-mediated TA-p73beta gene transfer increases chemosensitivity of human malignant melanomas.

Tuve S, Racek T, Niemetz A, Schultz J, Soengas MS, Pützer BM.

83) Cell. 1992 Aug 7;70(3):389-99.

The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.

Ridley AJ, Hall A.

84) Cancer Research. 1982 Dec;42(12):5183-90.

Altered organization of cell-substrate contacts and membrane-associated cytoskeleton in tumor cell variants exhibiting different metastatic capabilities.

Raz A, Geiger B.

85) The Journal of Cell Biology. 1989 Oct;109(4 Pt 1):1495-509.

Rearrangements of desmosomal and cytoskeletal proteins during the transition from epithelial to fibroblastoid organization in cultured rat bladder carcinoma cells.

Boyer B, Tucker GC, Vallés AM, Franke WW, Thiery JP.

86) Cancer Research. 2004 Mar 1;64(5):1687-94.

Altered metastatic behavior of human breast cancer cells after experimental manipulation of matrix metalloproteinase 8 gene expression.

Montel V, Kleeman J, Agarwal D, Spinella D, Kawai K, Tarin D.

87) Nature Genetics. 2003 Nov;35(3):252-7. Epub 2003 Sep 28.

Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice.

Balbín M, Fueyo A, Tester AM, Pendás AM, Pitiot AS, Astudillo A, Overall CM, Shapiro SD, López-Otín C.

88) The Journal of Biological Chemistry. 2000 Dec 15;275(50):39647-53.

The orthologous human and murine semaphorin 6A-1 proteins (SEMA6A-1/Sema6A-1) bind to the enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like protein (EVL) via a novel carboxyl-terminal zyxin-like domain.

Klostermann A, Lutz B, Gertler F, Behl C.

89) Molecular Cancer Therapeutics. 2008 Jan;7(1):233-41. Epub 2008 Jan 9.

From plasma membrane to cytoskeleton: a novel function for semaphorin 6A.

Prisley S, Mozzetti S, Filippetti F, De Donato M, Raspaglio G, Cicchillitti L, Scambia G, Ferlini C.

90) Clinical Cancer Research. 1997 Jun;3(6):983-92.

Elevated stromal chondroitin sulfate glycosaminoglycan predicts progression in early-stage prostate cancer.

Ricciardelli C, Mayne K, Sykes PJ, Raymond WA, McCaul K, Marshall VR, Tilley WD, Skinner JM, Horsfall DJ.

91) Clinical Cancer Research. 2002 Apr;8(4):1054-60.

Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer.

Ricciardelli C, Brooks JH, Suwivat S, Sakko AJ, Mayne K, Raymond WA, Seshadri R, LeBaron RG, Horsfall DJ.

92) Nature. 1993 Dec 16;366(6456):704-7.

A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D.

93) Cell. 1998 Mar 20;92(6):725-34.

ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways.

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG.

94) Cell. 1999 Sep 17;98(6):859-69.

Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1.

Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC.

95) Biochimica et Biophysica Acta. 1994 May 27;1198(1):11-26.

Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness.

Birchmeier W, Behrens J.

96) Cancer Letters 1997 May 19;115(2):185-93.

Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms.

Glinsky GV, Glinsky VV, Ivanova AB, Hueser CJ.

97) The Journal of Biological Chemistry 2003 Apr 18;278(16):14230-6

Inactivation of retinoblastoma (RB) tumor suppressor by oncogenic isoforms of the p53 family member p73.

Stiewe T, Stanelle J, Theseling CC, Pollmeier B, Beitzinger M, Pützer BM.

98) Cancer Research 2002 Feb 1;62(3):636-41.

Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73.

Ishimoto O, Kawahara C, Enjo K, Obinata M, Nukiwa T, Ikawa S.

99) Molecular and Cellular Biology 2003 Aug;23(16):5540-55.

deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo.

Petrenko O, Zaika A, Moll UM.

100) Carcinogenesis. 2008 Jan;29(1):211-8. Epub 2007 Nov 4.

Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor DNp73.

Tannapfel A, John K, Mise N, Schmidt A, Buhlmann S, Ibrahim SM, Pützer BM.

101) Biochimica et Biophysica Acta. 2008 Apr;1785(2):207-16. Epub 2008 Feb 12.

DNp73 a matter of cancer: mechanisms and clinical implications.

Buhlmann S, Pützer BM.

102) Clinical Cancer Research 2004 Oct 15;10(20):6905-11.

Expression of deltaNp73 predicts poor prognosis in lung cancer.

Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Morita M, Funa K, Yasumoto K.

103) J Clin Pathol. 2005 Nov;58(11):1175-9.

Aberrant expression of DeltaNp73 in benign and malignant tumours of the prostate: correlation with Gleason score.

Guan M, Chen Y.

104) Leukemia Research 2006 Feb;30(2):170-7. Epub 2005 Aug 3.

Allelic expression and quantitative RT-PCR study of TAp73 and DeltaNp73 in non-Hodgkin's lymphomas.

Cuadros M, Ribas G, Fernández V, Rivas C, Benitez J, Martinez-Delgado B.

105) Cancer Research 2003 Sep 15;63(18):5829-37.

p73 tumor-suppressor activity is impaired in human thyroid cancer

Frasca F, Vella V, Aloisi A, Mandarino A, Mazzon E, Vigneri R, Vigneri P.

- 106) European Journal of Surgical Oncology. 2006 Mar;32(2):228-30. Expression of TAp73 and DeltaNp73 isoform transcripts in thyroid tumours.
Ferru A, Denis S, Guilhot J, Gibelin H, Tourani JM, Kraimps JL, Larsen CJ, Karayan-Tapon L.
- 107) Cell Death and Differentiation 2002 Mar;9(3):246-51.
Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients.
Casciano I, Mazzocco K, Boni L, Pagnan G, Banelli B, Allemanni G, Ponzoni M, Tonini GP, Romani M.
- 108) The American Journal of Pathology 2002 Feb;160(2):631-9.
DeltaN-p73alpha accumulates in human neuroblastic tumors.
Douc-Rasy S, Barrois M, Echeynne M, Kaghad M, Blanc E, Raguenez G, Goldschneider D, Terrier-Lacombe MJ, Hartmann O, Moll U, Caput D, Bénard J.
- 109) Oncogene. 2003 May 19;22(20):3138-51.
Apoptosis and melanoma chemoresistance.
Soengas MS, Lowe SW.
- 111) The Journal of Clinical Investigation 2001 Oct;108(7):991-9.
Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53.
Grossman D, Kim PJ, Blanc-Brude OP, Brash DE, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC.
- 112) Nature. 2001 Jan 11;409(6817):207-11.
Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma.
Soengas MS, Capodieci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardó C, Lowe SW.
- 113) Nature. 2002 Jun 27;417(6892):949-54. Epub 2002 Jun 9.
Mutations of the BRAF gene in human cancer.
Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA.
- 114) Genes & Development 2000 Aug 1;14(15):1837-51.
Wnt signaling and cancer.
Polakis P.
- 115) Bioessays. 1999 Dec;21(12):1021-30.
beta-catenin signaling and cancer.
Morin PJ.
- 116) Current Opinion in Genetics & Development 1998 Feb;8(1):95-102.
Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling.
Willert K, Nusse R.

117) Cell. 1995 Oct 6;83(1):5-8.

The body language of cells: the intimate connection between cell adhesion and behavior.

Klymkowsky MW, Parr B

118) Molecular Pathology 1997 Dec;50(6):289-90.

Cadherin and catenin biology represent a global mechanism for epithelial cancer progression.

Jankowski JA, Bruton R, Shepherd N, Sanders DS.

119) Clinical Cancer Research 2003 Aug 15;9(9):3383-8.

Reduced beta-catenin expression in the cytoplasm of advanced-stage superficial spreading malignant melanoma.

Maeldandsmo GM, Holm R, Nesland JM, Fodstad Ø, Flørenes VA.

120) The American Journal of Pathology 1999 Aug;155(2):527-36.

beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas : relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome.

Gamallo C, Palacios J, Moreno G, Calvo de Mora J, Suárez A, Armas A.

121) The Journal of Pathology 2001 Jan;193(1):95-101.

Expression of mutant nuclear beta-catenin correlates with non-invasive hepatocellular carcinoma, absence of portal vein spread, and good prognosis.

Mao TL, Chu JS, Jeng YM, Lai PL, Hsu HC.

122) The British Journal of Dermatology 2001 Aug;145(2):210-6.

Loss of beta-catenin expression associated with disease progression in malignant melanoma.

Kageshita T, Hamby CV, Ishihara T, Matsumoto K, Saida T, Ono T.

123) Molecular Pathology 1999 Jun;52(3):151-7.

Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours.

Sanders DS, Blessing K, Hassan GA, Bruton R, Marsden JR, Jankowski J.

124) The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings. 1996 Apr;1(2):203-8.

Critical determinants of melanoma metastasis.

Fidler IJ.

125) American journal of clinical pathology 1995 Mar;103(3):300-7.

Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis.

Staunton MJ, Gaffney EF.

126) The Journal of investigative dermatology 1994 May;102(5):819-21.

Absence of p53 gene mutations in cutaneous melanoma.

Lübbe J, Reichel M, Burg G, Kleihues P.

127) Journal of Clinical Pathology 2005 Nov;58(11):1175-9.

Aberrant expression of DeltaNp73 in benign and malignant tumours of the prostate: correlation with Gleason score.

Guan M, Chen Y.

128) Clinical Cancer Research 2006 Jul 1;12(13):3922-7.

Expression of deltaNp73 and TAp73alpha independently associated with radiosensitivities and prognoses in cervical squamous cell carcinoma.

Liu SS, Chan KY, Cheung AN, Liao XY, Leung TW, Ngan HY.

129) Cell Death and Differentiation 2005 Dec;12(12):1564-77. Epub 2005 Sep 30.

TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma.

Müller M, Schilling T, Sayan AE, Kairat A, Lorenz K, Schulze-Bergkamen H, Oren M, Koch A, Tannapfel A, Stremmel W, Melino G, Krammer PH.

130) Cell Proliferation 2001 Aug;34(4):199-210.

A study of death by anoikis in cultured epithelial cells.

Bretland AJ, Lawry J, Sharrard RM.

131) Cancer Research 2001 Feb 15;61(4):1707-16.

Anoikis and metastatic potential of cloudman S91 melanoma cells.

Zhu Z, Sanchez-Sweatman O, Huang X, Wiltrout R, Khokha R, Zhao Q, Gorelik E.

132) Eye. 2005 Mar;19(3):342-8.

Invasive and noninvasive uveal melanomas have different adhesive properties.

Woodward JK, Rennie IG, Elshaw SR, Burn JL, Sisley K.

133) Cancer Letters 2008 Nov 8;270(2):354-61. Epub 2008 Jul 7.

Mutation of Y925F in focal adhesion kinase (FAK) suppresses melanoma cell proliferation and metastasis.

Kaneda T, Sonoda Y, Ando K, Suzuki T, Sasaki Y, Oshio T, Tago M, Kasahara T.

134) Oncology Reports 2008 Sep;20(3):557-65.

Long exposure of non-cytotoxic concentrations of methylselenol suppresses the invasive potential of B16F10 melanoma.

Kim A, Jung JY, Son M, Lee SH, Lim JS, Chung AS.

135) Modern Pathology. 2007 Mar;20(3):339-43. Epub 2007 Feb 2.

Coexpression of Arp2 and WAVE2 predicts poor outcome in invasive breast carcinoma.

Iwaya K, Norio K, Mukai K.

136) Cancer Science. 2007 Jul;98(7):992-9. Epub 2007 Apr 23.

Correlation between liver metastasis of the colocalization of actin-related protein 2 and 3 complex and WAVE2 in colorectal carcinoma.

Iwaya K, Oikawa K, Semba S, Tsuchiya B, Mukai Y, Otsubo T, Nagao T, Izumi M, Kuroda M, Domoto H, Mukai K.

137) Biochemical Society Transactions. 2005 Nov;33(Pt 5):891-5.

Rho GTPases and the control of cell behaviour.

Hall A.

138) Cancer Metastasis Reviews. 2009 Jan 24.

EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion.

Yilmaz M, Christofori G.

139) Nature Reviews. Cancer. 2002 Feb;2(2):133-42.

RHO-GTPases and cancer.

Sahai E, Marshall CJ.

140) Nature. 2000 Aug 3;406(6795):532-5.

Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC.

Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO.

141) The Journal of Investigative Dermatology 2002 Nov;119(5):1172-6.

Isoprenylation is necessary for the full invasive potential of RhoA overexpression in human melanoma cells.

Collisson EA, Carranza DC, Chen IY, Kolodney MS.

142) Anticancer Research. 2008 Jul-Aug;28(4B):2225-32.

Arp2/3 overexpression contributed to pathogenesis, growth and invasion of gastric carcinoma.

Zheng HC, Zheng YS, Li XH, Takahashi H, Hara T, Masuda S, Yang XH, Guan YF, Takano Y.

143) Modern Pathology. 2004 Apr;17(4):461-7.

Involvement of Arp2/3 complex in the process of colorectal carcinogenesis.

Otsubo T, Iwaya K, Mukai Y, Mizokami Y, Serizawa H, Matsuoka T, Mukai K.

144) Oncogene (2005) 24, 1309–1319.

Rac-WAVE2 signaling is involved in the invasive and metastatic phenotypes of murine melanoma cells

Shusaku Kurisu, Shiro Suetsugu, Daisuke Yamazaki, Hideki Yamaguchi and Tadaomi Takenawa

145) British Journal of Cancer. 2003 Feb 24;88(4):537-47.

Independent prognostic value of fascin immunoreactivity in stage I nonsmall cell lung cancer.

Pelosi G, Pastorino U, Pasini F, Maissonneuve P, Fraggetta F, Iannucci A, Sonzogni A, De Manzoni G, Terzi A, Durante E, Bresaola E, Pezzella F, Viale G.

146) Oncology. 2004;67(3-4):262-70.

The prognostic relevance of fascin expression in human gastric carcinoma.

Hashimoto Y, Shimada Y, Kawamura J, Yamasaki S, Imamura M.

147) Clinical Cancer Research. 2006 Mar 1;12(5):1533-9.

Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas.

Rodríguez-Pinilla SM, Sarrió D, Honrado E, Hardisson D, Calero F, Benitez J, Palacios J.

148) Cancer Research. 2005 Jul 15;65(14):5996-6000

The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia.

Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF.

149) Nature Reviews. Cancer. 2007 Jun;7(6):415-28.

Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?

Peinado H, Olmeda D, Cano A.

- 150) Blood. 2009 Feb 12;113(7):1513-21. Epub 2008 Nov 18.
Targeting PKC: a novel role for beta-catenin in ER stress and apoptotic signaling.
Raab MS, Breitzkreutz I, Tonon G, Zhang J, Hayden PJ, Nguyen T, Fruehauf JH, Lin BK, Chauhan D, Hideshima T, Munshi NC, Anderson KC, Podar K.
- 151) The American Journal of Pathology 2004 May;164(5):1739-49.
Beta-catenin simultaneously induces activation of the p53-p21WAF1 pathway and overexpression of cyclin D1 during squamous differentiation of endometrial carcinoma cells.
Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Hamano M, Okayasu I.
- 152) Molecular Biology of the Cell. 2000 Oct;11(10):3509-23.
Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators.
Kim K, Pang KM, Evans M, Hay ED.
- 153) Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004 Oct 1;322(4):1111-22.
S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature).
Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G.
- 154) The British Journal of Dermatology. 1997 Jul;137(1):39-43.
Immunohistochemical localization of the Ca²⁺ binding S100 proteins in normal human skin and melanocytic lesions.
Böni R, Burg G, Doguoglu A, Ilg EC, Schäfer BW, Müller B, Heizmann CW.
- 155) Oncogene. 2006 Jun 22;25(26):3628-37. Epub 2006 Jan 30.
S100A2 gene is a direct transcriptional target of p53 homologues during keratinocyte differentiation.
Lapi E, Iovino A, Fontemaggi G, Soliera AR, Iacovelli S, Sacchi A, Rechavi G, Givol D, Blandino G, Strano S.
- 156) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1991 Apr 1;88(7):2825-9
Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization.
Lee SW, Tomasetto C, Sager R.
- 157) Cancer Research. 2001 Nov 1;61(21):7999-8004.
Diminished expression of S100A2, a putative tumor suppressor, at early stage of human lung carcinogenesis.
Feng G, Xu X, Youssef EM, Lotan R.
- 158) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992 Mar 15;89(6):2504-8
Down-regulation of a member of the S100 gene family in mammary carcinoma cells and reexpression by azadeoxycytidine treatment.
Lee SW, Tomasetto C, Swisshelm K, Keyomarsi K, Sager R.
- 159) Head & Neck. 2007 Mar;29(3):236-43.
Down-regulation of S100A2 in lymph node metastases of head and neck cancer.
Zhang X, Hunt JL, Shin DM, Chen ZG.

- 160) International Journal of Cancer. 1997 Aug 22;74(4):464-9.
Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma.
Maeldandsmo GM, Flørenes VA, Mellingsaeter T, Hovig E, Kerbel RS, Fodstad O.
- 161) Gene. 1995 Dec 12;166(2):213-20.
Cloning of putative growth regulatory genes from primary human keratinocytes by subtractive hybridization.
Vellucci VF, Germino FJ, Reiss M.
- 162) Journal of Clinical Oncology. 2003 Jan 1;21(1):106-12.
Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma.
Gupta S, Hussain T, MacLennan GT, Fu P, Patel J, Mukhtar H.
- 163) Cancer Research. 2002 Dec 1;62(23):6823-6.
Gastric cancers overexpress S100A calcium-binding proteins.
El-Rifai W, Moskaluk CA, Abdrabbo MK, Harper J, Yoshida C, Riggins GJ, Frierson HF Jr, Powell SM.
- 164) Cancer Research. 2001 May 15;61(10):3869-76.
Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer.
Hough CD, Cho KR, Zonderman AB, Schwartz DR, Morin PJ.
- 165) Biochemical and biophysical research communications 2003 Jul 25;307(2):375-81.
Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays.
Hsieh HL, Schäfer BW, Sasaki N, Heizmann CW.
- 166) International Journal of Cancer. 2000 Jul 20;89(4):345-9.
Prognostic significance of the Ca(2+) binding protein S100A2 in laryngeal squamous-cell carcinoma.
Lauriola L, Michetti F, Maggiano N, Galli J, Cadoni G, Schäfer BW, Heizmann CW, Ranelletti FO.
- 167) Laboratory Investigation. 2001 Apr;81(4):599-612.
S100A2, a putative tumor suppressor gene, regulates in vitro squamous cell carcinoma migration.
Nagy N, Brenner C, Markadieu N, Chaboteaux C, Camby I, Schäfer BW, Pochet R, Heizmann CW, Salmon I, Kiss R, Decaestecker C.
- 168) Laryngoscope. 2000 Mar;110(3 Pt 1):374-81.
Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis.
Villaret DB, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever MA, Reed SG.
- 169) Anticancer Research. 2005 Mar-Apr;25(2B):1247-50.
S100A2 overexpression is frequently observed in esophageal squamous cell carcinoma.
Imazawa M, Hibi K, Fujitake S, Kodera Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A.
- 170) International Journal of Cancer. 2005 Aug 20;116(2):285-90.

Overexpression of S100A2 protein as a prognostic marker for patients with stage I non small cell lung cancer.

Wang H, Zhang Z, Li R, Ang KK, Zhang H, Caraway NP, Katz RL, Jiang F.

171) Cancer Research. 2004 Aug 15;64(16):5564-9.

S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer.

Diederichs S, Bulk E, Steffen B, Ji P, Tickenbrock L, Lang K, Zänker KS, Metzger R, Schneider PM, Gerke V, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C.

172) Clinical Cancer Research. 2009 Jan 1;15(1):22-9.

S100A2 induces metastasis in non-small cell lung cancer.

Bulk E, Sargin B, Krug U, Hascher A, Jun Y, Knop M, Kerkhoff C, Gerke V, Liersch R, Mesters RM, Hotfilder M, Marra A, Koschmieder S, Dugas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C.

173) Nucleic Acids Research. 2008 May;36(9):2969-80. Epub 2008 Apr 3.

Transcriptional activation of the tumor suppressor and differentiation gene S100A2 by a novel p63-binding site.

Kirschner RD, Sängler K, Müller GA, Engeland K.

174) FEBS Letters. 1999 Feb 26;445(2-3):265-8.

Transcriptional activation of the human S100A2 promoter by wild-type p53.

Tan M, Heizmann CW, Guan K, Schafer BW, Sun Y.

175) Clinical Cancer Research. 2003 Sep 15;9(11):4282-5.

Identification of S100A2 as a target of the DeltaNp63 oncogenic pathway.

Hibi K, Fujitake S, Takase T, Kodera Y, Ito K, Akiyama S, Shirane M, Nakao A.

176) Oncogene. 1996 Oct 17;13(8):1631-7.

Expression of the calcium-binding protein S100A4 (p9Ka) in MMTV-neu transgenic mice induces metastasis of mammary tumours.

Davies MP, Rudland PS, Robertson L, Parry EW, Jolicoeur P, Barraclough R.

177) Cancer Research. 2006 May 15;66(10):5173-80.

The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA.

Li ZH, Bresnick AR.

178) The Journal of Biological Chemistry. 1994 Dec 30;269(52):32992-8.

A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican.

Dours-Zimmermann MT, Zimmermann DR.

179) Journal of Comparative Pathology. 2004 Nov;131(4):259-70.

Versican and hyaluronan expression in canine colonic adenomas and carcinomas: relation to malignancy and depth of tumour invasion.

Mukaratirwa S, van Ederen AM, Gruys E, Nederbragt H.

180) The American Journal of Pathology. 1996 Jun;148(6):1721-6.

Tumor-associated hyaluronan. Providing an extracellular matrix that facilitates invasion.

Knudson W.

181) The Journal of Biological Chemistry. 1989 May 15;264(14):8012-8.

Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates.

Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM, Kimata K.

182) Cancer Research. 1987 Jan 1;47(1):160-8.

Isolation and characterization of proteoglycans from human nonepithelial tumors.

Sobue M, Takeuchi J, Yoshida K, Akao S, Fukatsu T, Nagasaka T, Nakashima N.

183) The American Journal of Pathology. 2002 Feb;160(2):549-57.

Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development.

Touab M, Villena J, Barranco C, Arumí-Uría M, Bassols A.

184) American journal of clinical pathology. 2003 Apr;119(4):587-93.

Expression of the proteoglycans versican and mel-CSPG in dysplastic nevi.

Touab M, Arumi-Uría M, Barranco C, Bassols A.

185) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002 Nov 26;99(24):15632-7.

Gene expression profiling of isogenic cells with different TP53 gene dosage reveals numerous genes that are affected by TP53 dosage and identifies CSPG2 as a direct target of p53.

Yoon H, Liyanarachchi S, Wright FA, Davuluri R, Lockman JC, de la Chapelle A, Pellegata NS.

186) Cell. 1997 Jan 24;88(2):277-85.

Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J.

187) Cancer Research. 2002 Apr 1;62(7):1944-7.

Endostatin regulates endothelial cell adhesion and cytoskeletal organization.

Dixelius J, Cross M, Matsumoto T, Sasaki T, Timpl R, Claesson-Welsh L.

188) Biochemical and biophysical research communications. 1999 May 10;258(2):345-52.

Cloning, expression, and in vitro activity of human endostatin.

Dhanabal M, Volk R, Ramchandran R, Simons M, Sukhatme VP.

189) The Journal of biological chemistry. 2002 May 10;277(19):16464-9. Epub 2002 Jan 28.

Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1.

Hanai J, Dhanabal M, Karumanchi SA, Albanese C, Waterman M, Chan B, Ramchandran R, Pestell R, Sukhatme VP.

190) FEBS Letters. 2000 Dec 15;486(3):247-51.

Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases.

Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaissé J.

191) Cancer Research. 1999 Dec 15;59(24):6052-6.

The generation of endostatin is mediated by elastase.

Wen W, Moses MA, Wiederschain D, Arbiser JL, Folkman J.

192) *Annals of surgical oncology*. 2001 Oct;8(9):741-5.

A prospective analysis of plasma endostatin levels in colorectal cancer patients with liver metastases.

Feldman AL, Alexander HR Jr, Bartlett DL, Kranda KC, Miller MS, Costouros NG, Choyke PL, Libutti SK.

193) *Lung Cancer*. 2002 Jan;35(1):29-34.

Serum endostatin correlates with progression and prognosis of non-small cell lung cancer.

Suzuki M, Iizasa T, Ko E, Baba M, Saitoh Y, Shibuya K, Sekine Y, Yoshida S, Hiroshima K, Fujisawa T.

194) *Clinical Cancer Research*. 2000 Dec;6(12):4628-34.

Serum endostatin levels are elevated and correlate with serum vascular endothelial growth factor levels in patients with stage IV clear cell renal cancer.

Feldman AL, Tamarkin L, Paciotti GF, Simpson BW, Linehan WM, Yang JC, Fogler WE, Turner EM, Alexander HR Jr, Libutti SK.

195) *Cancer*. 2002 Jan 1;94(1):14-7.

Clinical significance of plasma endostatin in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome.

Lai R, Estey E, Shen Y, Despa S, Kantarjian H, Beran M, Maushouri T, Quackenbush RC, Keating M, Albitar M.

196) *The British journal of dermatology*. 2007 Apr;156(4):653-8. Epub 2007 Jan 30.

Early increase in serum levels of the angiogenesis-inhibitor endostatin and of basic fibroblast growth factor in melanoma patients during disease progression.

Kurschat P, Eming S, Nashan D, Krieg T, Mauch C.

197) *Current Drug Targets*. 2005 Sep;6(6):665-82.

Decreasing the metastatic potential in cancers--targeting the heparan sulfate proteoglycans.

Fjeldstad K, Kolset SO.

198) *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2007 Jun;7(6):649-61.

Angiogenesis and metastasis inhibitors for the treatment of malignant melanoma.

Abe R, Fujita Y, Yamagishi S.

199) *Science*. 2006 Aug 18;313(5789):968-71.

p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase.

Teodoro JG, Parker AE, Zhu X, Green MR.

200) *Cancer Research*. 2005 Jun 15;65(12):5096-104.

A genomic map of p53 binding sites identifies novel p53 targets involved in an apoptotic network.

Miled C, Pontoglio M, Garbay S, Yaniv M, Weitzman JB.

201) *Biochemical and biophysical research communications* 1991 Apr 15;176(1):309-14.

Characterization of monocyte chemotactic protein-1 binding to human monocytes.

Valente AJ, Rozek MM, Schwartz CJ, Graves DT.

202) European journal of immunology. 1994 Dec;24(12):3233-6.

Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3.

Allavena P, Bianchi G, Zhou D, van Damme J, Jílek P, Sozzani S, Mantovani A.

203) The Journal of Investigative Dermatology. 2002 Jun;118(6):915-22.

The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis.

Payne AS, Cornelius LA.

204) Immunology Today. 1992 Jul;13(7):265-70.

The origin and function of tumor-associated macrophages.

Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L.

205) International Journal of Cancer. 2000 Jan 15;85(2):182-8.

Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha.

Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M.

206) Nature Reviews. Cancer. 2001 Oct;1(1):46-54.

Putting tumours in context.

Bissell MJ, Radisky D.

207) Nature. 1998 Mar 12;392(6672):190-3.

A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma.

Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G.

208) The Journal of Pathology. 1998 Dec;186(4):350-5.

E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions.

Silye R, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Poole S, van Noorden S, Batchelor W, Regele H, Segal W, Boesmueller H, Krausz T, Pignatelli M.

209) The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings. 1996 Apr;1(2):188-94.

Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas.

Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M.

210) Oncogene. 2001 Dec 6;20(56):8125-35.

Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development.

Li G, Schaidt H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M.

211) Cancer Research. 1991 Sep 15;51(18):4815-20.

Induction of growth factor RNA expression in human malignant melanoma: markers of transformation.

Albino AP, Davis BM, Nanus DM.

212) The Journal of Biological Chemistry 2003 Jun 6;278(23):21113-23.

Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions.

Peinado H, Quintanilla M, Cano A.

213) Nature Structural Biology. 2003 Oct;10(10):843-8. Epub 2003 Sep 7.

The ligand-binding face of the semaphorins revealed by the high-resolution crystal structure of SEMA4D.

Love CA, Harlos K, Mavaddat N, Davis SJ, Stuart DI, Jones EY, Esnouf RM.

214) Neuron. 2003 Aug 14;39(4):589-98.

Structure of the semaphorin-3A receptor binding module.

Antipenko A, Himanen JP, van Leyen K, Nardi-Dei V, Lesniak J, Barton WA, Rajashankar KR, Lu M, Hoemme C, Püschel AW, Nikolov DB.

215) Nature Reviews. Molecular Cell Biology. 2005 Oct;6(10):789-800.

Semaphorins command cells to move.

Kruger RP, Aurandt J, Guan KL.

216) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002 Sep 17;99(19):12085-90.

The semaphorin receptor plexin-B1 signals through a direct interaction with the Rho-specific nucleotide exchange factor, LARG.

Aurandt J, Vikis HG, Gutkind JS, Ahn N, Guan KL.

217) Science. 2004 Aug 6;305(5685):862-5.

The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras.

Oinuma I, Ishikawa Y, Katoh H, Negishi M.

218) Cancer Biology & Therapy. 2005 Jun;4(6):659-68.

Recombinant semaphorin 6A-1 ectodomain inhibits in vivo growth factor and tumor cell line-induced angiogenesis.

Dhanabal M, Wu F, Alvarez E, McQueeney KD, Jeffers M, MacDougall J, Boldog FL, Hackett C, Shenoy S, Khramtsov N, Weiner J, Lichenstein HS, LaRochelle WJ.

219) Molecular Cancer Therapeutics. 2008 Jan;7(1):233-41.

From plasma membrane to cytoskeleton: a novel function for semaphorin 6A.

Prisleri S, Mozzetti S, Filippetti F, De Donato M, Raspaglio G, Cicchillitti L, Scambia G, Ferlini C.

220) Current Opinion in Neurobiology. 2008 Jun;18(3):245-50.

L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth.

Schmid RS, Maness PF.

221) The Journal of Neuroscience. 2002 Jun 15;22(12):4918-31.

The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins.

Thelen K, Kedar V, Panicker AK, Schmid RS, Midkiff BR, Maness PF.

222) The Journal of Cell Biology. 2000 Jun 26;149(7):1485-502.

Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment.

Silletti S, Mei F, Sheppard D, Montgomery AM

223) The Journal of Biological Chemistry. 2003 Jul 4;278(27):25024-31.

Close homolog of L1 is an enhancer of integrin-mediated cell migration.

Buhusi M, Midkiff BR, Gates AM, Richter M, Schachner M, Maness PF.

224) International Journal of Cancer. 2006 Aug 1;119(3):549-55.

The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression.

Meier F, Busch S, Gast D, Göppert A, Altevogt P, Maczey E, Riedle S, Garbe C, Schitteck B.

225) Cancer Letters. 2003 Jan 28;189(2):237-47.

L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma.

Fogel M, Mechtersheimer S, Huszar M, Smirnov A, Abu-Dahi A, Tilgen W, Reichrath J, Georg T, Altevogt P, Gutwein P.

226) European Journal of Cancer. 2002 Sep;38(13):1708-16.

Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma.

Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U.

227) Cancer Research. 2004 Dec 15;64(24):8891-900.

Estrogen receptor genotypes and haplotypes associated with breast cancer risk.

Gold B, Kalush F, Bergeron J, Scott K, Mitra N, Wilson K, Ellis N, Huang H, Chen M, Lippert R, Halldorsson BV, Woodworth B, White T, Clark AG, Parl FF, Broder S, Dean M, Offit K.

228) Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer. 2008 Feb;17(2):393-6.

Comprehensive evaluation of ESR2 variation and ovarian cancer risk.

Leigh Pearce C, Near AM, Butler JL, Van Den Berg D, Bretsky P, Conti DV, Stram DO, Pike MC, Hirschhorn JN, Wu AH.

229) European Journal of Gynaecological Oncology. 2008;29(4):313-20.

Genetic polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer: a review.

Bugano DD, Conforti-Froes N, Yamaguchi NH, Baracat EC.

230) Current Topics in Developmental Biology. 2003;54:207-32.

DPPIV, seprase, and related serine peptidases in multiple cellular functions.

Chen WT, Kelly T, Ghersi G.

231) Regulatory Peptides. 1999 Nov 30;85(1):9-24.

Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides.

Mentlein R.

232) The Journal of Biological Chemistry. 2001 Aug 10;276(32):29839-45. Epub 2001 Jun 4

Kinetic investigation of chemokine truncation by CD26/dipeptidyl peptidase IV reveals a striking selectivity within the chemokine family.

Lambeir AM, Proost P, Durinx C, Bal G, Senten K, Augustyns K, Scharpé S, Van Damme J, De Meester I.

233) FEBS Letters. 1998 Jul 31;432(1-2):73-6.

Processing by CD26/dipeptidyl-peptidase IV reduces the chemotactic and anti-HIV-1 activity of stromal-cell-derived factor-1alpha.

Proost P, Struyf S, Schols D, Durinx C, Wuyts A, Lenaerts JP, De Clercq E, De Meester I, Van Damme J.

234) The Journal of Experimental Medicine. 1999 Aug 2;190(3):311-22.

A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells.

Wesley UV, Albino AP, Tiwari S, Houghton AN.

235) FEBS Letters. 2004 Feb 27;560(1-3):192-8.

Sox6 overexpression causes cellular aggregation and the neuronal differentiation of P19 embryonic carcinoma cells in the absence of retinoic acid.

Hamada-Kanazawa M, Ishikawa K, Nomoto K, Uozumi T, Kawai Y, Narahara M, Miyake M.

236) Molecular Pathology. 1997 Apr;50(2):57-71.

CD44 and the adhesion of neoplastic cells.

Rudzki Z, Jothy S.

237) Molecular and Cellular Biology. 1997 May;17(5):2521-8.

Heteromeric and homomeric interactions correlate with signaling activity and functional cooperativity of Smad3 and Smad4/DPC4.

Wu RY, Zhang Y, Feng XH, Derynck R.

238) Nature. 1996 Oct 31;383(6603):832-6.

Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways.

Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J.

239) The Journal of Biological Chemistry. 2000 Dec 15;275(50):39146-51.

Growth inhibition by insulin-like growth factor-binding protein-3 in T47D breast cancer cells requires transforming growth factor-beta (TGF-beta) and the type II TGF-beta receptor.

Fanayan S, Firth SM, Butt AJ, Baxter RC.

240) Molecular Cancer Therapeutics. 2006 Dec;5(12):3078-84.

Association of insulin-like growth factor binding protein-3 expression with melanoma progression.

Xi Y, Nakajima G, Hamil T, Fodstad O, Riker A, Ju J.

241) Anticancer Research. 1994 Nov-Dec;14(6B):2565-71.

Paracrine and autocrine regulation of human melanocyte and melanoma cell growth by transforming growth factor beta in vitro.

Krasagakis K, Garbe C, Schrier PI, Orfanos CE.

242) The American Journal of Pathology. 1994 Jul;145(1):97-104.

Expression of transforming growth factor-beta 2 in malignant melanoma correlates with the depth of tumor invasion. Implications for tumor progression.

Reed JA, McNutt NS, Prieto VG, Albino AP.

243) The American Journal of Pathology. 1996 Jun;148(6):1887-94.
Melanoma-associated expression of transforming growth factor-beta isoforms.
Van Belle P, Rodeck U, Nuamah I, Halpern AC, Elder DE.

244) The Journal of Biological Chemistry. 2007 Jul 13;282(28):20059-63.
JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines.
Schindler C, Levy DE, Decker T.

245) Nature. 1993 Nov 11;366(6451):166-70.
Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway.
Watling D, Guschin D, Müller M, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Rogers NC, Schindler C, Stark GR, Ihle JN, et al.

246) The Journal of Biological Chemistry. 2009 May 1;284(18):12306-17.
Structure and regulation of the versican promoter: the versican promoter is regulated by AP-1 and TCF transcription factors in invasive human melanoma cells.
Domenzain-Reyna C, Hernández D, Miquel-Serra L, Docampo MJ, Badenas C, Fabra A, Bassols A.

247) BMC Developmental Biology. 2002 Jul 2;2:8.
A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells.
Willert J, Epping M, Pollack JR, Brown PO, Nusse R.

248) The Journal of Biological Chemistry. 2005 Dec 9;280(49):40402-5.
C-terminal p73 isoforms repress transcriptional activity of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter.
Racek T, Mise N, Li Z, Stoll A, Pützer BM.

249) Oncogene. 2006 Feb 9;25(6):813-26.
Regulation of telomerase activity by the p53 family member p73.
Beitzinger M, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, Stiewe T.

250) International Journal of Cancer. 1996 Sep 17;67(6):831-41.
Effect of mts1 (S100A4) expression on the progression of human breast cancer cells.
Grigorian M, Ambartsumian N, Lykkesfeldt AE, Bastholm L, Elling F, Georgiev G, Lukanidin E.

251) Oncogene. 1997 Jan 23;14(3):331-7.
Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding an S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells.
Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S.

252) The Journal of Biological Chemistry. 2001 Jun 22;276(25):22699-708.
Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction.
Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriaievska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E.

Danksagung

Allen voran gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Dr. Brigitte Pützer für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas, für die hilfreichen Diskussionen und die Korrektur der Arbeit.

Die Realisierung und Auswertung der Array-Analysen verdanke ich zu großen Teilen Dr. Dirk Koczan vom Institut für Immunologie der Universität Rostock und meinem Kollegen David Engelmann.

Dr. Frank Lüthen aus der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock danke ich für die wunderschönen Aufnahmen am Laserscanning-Mikroskop.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Kollegen für ihre praktische und moralische Unterstützung und für eine freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken: Katja John, Anja Stoll, Anke Schmidt, Zhengpeng Li, Sven Buhlmann, Vijay Alla, Susanne Knoll, Julia Schultz, Tomas Racek, Nikica Mise, Stephan Emmrich, Marc Steder und Ingrid Winkler.

Ohne die Unterstützung meines Lebensgefährten Andreas Rahn in jedem Stadium der Arbeit, aber vor allem während der letzten Monate und Wochen, wäre diese Dissertation niemals vollendet worden. Danke!

Für ihre Talent, mir Ruhemomente zwischen den Stressphasen zu verschaffen, danke ich meiner kleinen Tochter Amelie.

Publikationen

Tuve S, Racek T, Niemetz A, Schultz J, Soengas MS, Pützer BM.

Adenovirus-mediated TA-p73b gene transfer increases chemosensitivity of human malignant melanomas. /

Apoptosis 2006 Feb;11(2):235-43.

Papp T, Niemetz A, Dosdahl N, Kumar K, Schiffmann D.

Mutational analysis of Chk1, Chk2, Apaf1 and Rb1 in human malignant melanoma cell lines.

Oncology Reports 2007 Jan;17(1):135-40.

Alla V, Engelmann D, Niemetz A, Pahnke J, Schmidt A, Kunz M, Emmrich S, Steder M, Koczan D, Pützer BM

E2F1 determines human melanoma progression and metastasis via EGF receptor signaling
Journal of the National Cancer Institute (submitted)

Konferenzbeiträge (Poster)

Tuve S, Racek T, Niemetz A, Schultz J, Soengas MS, Pützer BM.

Adenovirus-mediated TA-p73b gene transfer leads to chemosensitization of human malignant melanoma.

ASGT, Baltimore, USA (2006).

Tuve S, Racek T, Niemetz A, Schultz J, Soengas MS, Pützer BM. TA-p73b

Acts as an Anticancer Agent by Sensitizing Human Malignant Melanomas to Chemotherapy.

13. Jahrestagung der DG-GT, Düsseldorf, Germany (2006).

Schmidt A, Alla V, Buhlmann S, John K, Niemetz A, Engelmann D, Emmrich S, Rimpler U, Knoll S, Stoll A, Pützer BM.

Krebstherapie kennt kein Einheitsprinzip: Molekulare Tumordiagnostik als Grundlage für die Entwicklung zielgerichteter Krebstherapeutika.

LNdW, Rostock, Germany (2008).

Erklärungen

1. Erklärung:

Ich beantrage hiermit unwiderruflich, gem. §12 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock, die mündliche Prüfung in Form eines öffentlichen wissenschaftlichen Kolloquiums abzulegen.

Berlin, 8.06.2009

Annett Niemetz

2. Erklärung:

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Berlin, 8.06.2009

Annett Niemetz

3. Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 4 Abs. 1 (k) der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Berlin, 8.06.2009

Annett Niemetz